

112
2 Gen



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA VALORACION
DE PROGESTERONA Y BENZOATO DE ESTRADIOL
EN UN PRODUCTO INYECTABLE

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

ANDRES VEGA PEREZ



México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Página
I INTRODUCCION	4
II GENERALIDADES SOBRE ESTEROIDES	6
II.1 Estructura y nomenclatura de los esteroides.	6
II.2 Tipos de esteroides.	7
III GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA	15
III.1 Fundamento de la cromatografía en capa delgada.	15
III.2 Adsorbentes para cromatografía en capa delgada.	18
III.3 Disolventes para cromatografía en capa delgada.	21
III.4 Relación entre estructura química de los esteroides y su comportamiento cromatográfico.	24
III.5 Métodos usuales de detección para cromatografía en capa delgada.	26
IV PARTE EXPERIMENTAL	29
IV.1 Desarrollo del método analítico.	29
IV.2 Procedimiento.	31
IV.3 Material y equipo	33
V RESULTADOS Y VALIDACION DEL METODO	35
VI CONCLUSION	43
VII BIBLIOGRAFIA	44

I INTRODUCCION

La presente tesis profesional tiene como principal objetivo desarrollar un método analítico para la valoración de dos esteroides de tipo hormonal que se encuentran combinados en un producto inyectable. Estos son progesterona y benzoato de estradiol. El método propuesto - consiste primero en una separación de los dos compuestos por el método de cromatografía en capa delgada y posteriormente la determinación cuantitativa de cada uno de ellos por el método espectrofotométrico.

La necesidad de éste estudio se generó en el Departamento de Control de Calidad de los Laboratorios Farmacéuticos que fabrican dicho producto, ya que éste tipo de farmacos son de uso delicado por sus efectos farmacológicos a mínimas dosis y es necesario contar con métodos de análisis que permitan evaluar adecuadamente la calidad de los medicamentos que se elaboran con ellos.

Para lograr éste objetivo fué necesario considerar las limitantes - que se presentan en todo trabajo de desarrollo analítico dentro de la industria. El método debe ser desarrollado con el equipo disponible y los resultados obtenidos deberán ser precisos, exactos y reproducibles.

En síntesis éste trabajo comprende cuatro partes principales: la primera comprende las generalidades sobre el tipo de sustancias de que se trata, es decir, sobre los esteroides, su estructura, su clasificación, su acción farmacológica, etc.

En la segunda parte se hace un análisis detallado de la Cromatografía en capa delgada.

La tercera se refiere a la parte experimental donde se describe la ruta seguida para diseñar el método analítico.

Y finalmente en la cuarta parte se citan los resultados obtenidos y se realiza la validación del método para determinar su precisión, exactitud y reproducibilidad.

Los problemas y dificultades que se superaron durante el desarrollo del presente trabajo fueron numerosos, ellos nos obligan a perseve -

rar en el estudio y en la investigación de la química analítica cuantitativa, base del conocimiento del Químico Farmacéutico Biólogo, en su tarea específica de controlar la calidad de los medicamentos que se fabrican en la industria farmacéutica.

II GENERALIDADES SOBRE ESTEROIDES.

II.1 ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA DE LOS ESTEROIDES.

Las hormonas esteroidales y sus metabolitos derivan de tres hidrocarburos: el estrano, el androstano y el pregnano. Ellos tienen como característica en común el poseer un núcleo tetracíclico constituido por tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano. El núcleo tetracíclico común a todos los esteroides es un hidrocarburo saturado denominado gonano (fig. 1 a) el cual posee diecisiete átomos de carbono. Si fijamos un sustituyente metilo en la posición trece pasamos al estrano (fig. 1 b), molécula con dieciocho átomos de carbono; de esta molécula se derivan las hormonas estrogénicas. Colocando un segundo meti

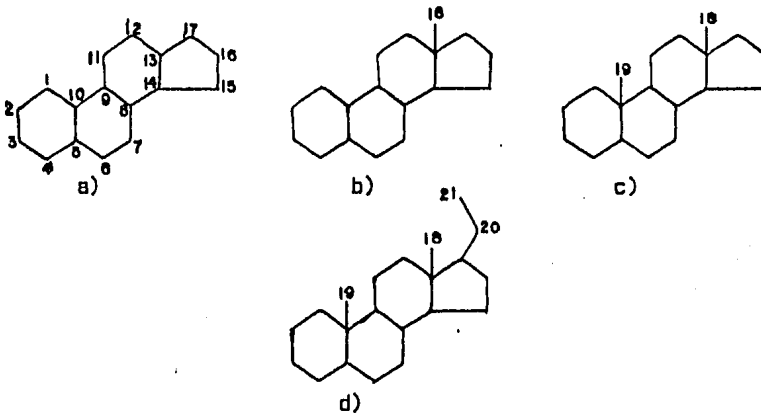


Fig. 1 a) gonano; b) estrano; c) androstano; d) pregnano.

lo ahora en la posición diez, obtenemos el hidrocarburo con -- diecinueve átomos de carbono, es el androstano (fig. 1 c) de esta estructura se derivan las hormonas masculinas. Adicionando un tercer radical, siendo este un radical etilo en la posición -- más alta del anillo de ciclopentano, sobre el carbono diecisiete, obtenemos un hidrocarburo de veintiún átomos de carbono, con dos sustituyentes metilo y un grupo etilo, este hidrocarburo es el -- pregnano (fig. 1 d), que constituye el esqueleto de las hor --

monas del cuerpo amarillo ovárico y los corticosuprarrenales. Con excepción de los átomos de carbono que son puntos de unión de los anillos y el átomo de carbono diecisiete, todos los otros átomos de carbono tienen dos valencias para dos hidrógenos. Los átomos de carbono 5, 8, 9, 10, 13, 14 y 17 responden a la definición de átomos de carbono asimétrico, tres valencias están ligadas a los diferentes miembros de la estructura del anillo y la cuarta valencia a un hidrógeno o a un grupo metilo o etilo. A cada uno de estos centros de simetría corresponden dos isómeros, esto predice para el pregnano la existencia de 128 isómeros.

Dentro de los esteroides naturales, todos los centros difentes tienen una configuración idéntica con la excepción de la unión carbono-hidrógeno del átomo cinco, que presenta una isomería alfa o beta. Las representaciones planas de las moléculas no corresponden a la realidad de la estructura, pero es la forma común de representarlas.

II.2 TIPOS DE ESTEROIDES.

Los compuestos esteroidales están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los organismos vivientes vegetales y animales, contienen esteroides que juegan un papel importante en su actividad vital.

Los diferentes esteroides parten de un número mínimo de diecisiete átomos de carbono. Una característica de ellos que se mencionó anteriormente es el poseer un núcleo tetracíclico. A medida que se van conociendo las diferentes estructuras esteroidales se observa que una variación mínima en los sustituyentes del esqueleto esteroideal, origina un compuesto con propiedades diferentes.

El colesterol es un esteroide a partir del cual son secretadas por diversas glándulas otros esteroides de dieciocho, diecinueve y veintiún átomos de carbono.

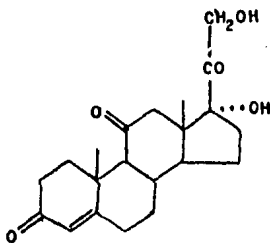
Entre los diferentes tipos de compuestos con estructura esteroi

dal se encuentran:

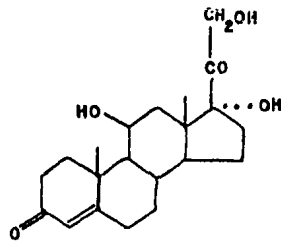
- A) Hormonas adrenocorticales.
- B) Sapogeninas Esteroidales.
- C) Algunos alcaloides.
- D) Acidos y Alcoholes biliares.
- E) Principios activos cardiacos.
- F) Hormonas sexuales.

- A) Hormonas Adrenocorticales: las hormonas adrenocorticales provienen de la corteza de las glándulas adrenales, que se localizan en la parte superior de cada riñón. Estas glándulas producen seis hormonas importantes y son: cortisona, cortisol, -corticosterona, desoxicorticosterona, dehidrocorticosterona y 17 alfa-hidroxicorticosterona. Sus principales funciones son:
- a) Regular el metabolismo de carbohidratos y proteínas.
 - b) Regular el metabolismo de minerales, sales y agua.
 - c) Como función farmacológica tienen un efecto antiinflamatorio y contra la alergia.
 - d) Influyen en el desarrollo sexual.

Ejemplo de estos compuestos pueden ser:



Cortisona



Cortisol

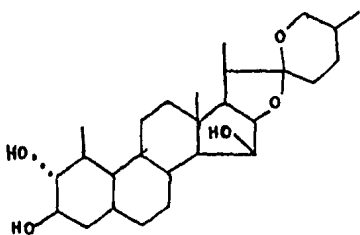
- B) Sapogeninas Esteroidales: constituyen el aglucón de los glucósidos llamados saponinas y pueden haber también del tipo triterpenoide. Las saponinas son extraídas de plantas con alto contenido de glucósidos, tienen un número de carbonos entre -60 y 40. Las saponinas esteroidales una vez obtenidas por hidrólisis de las saponinas, tienen 27 carbonos en general. Las principales sapogeninas esteroidales son: digitogenina, -gitogenina, tiogenina, sarsapogenina, diosgenina, yucagenina,

esmilagenina y kammogenina.

Sus principales funciones son:

- a) Como detergentes (no alcalinos).
- b) Como agentes espumantes en extinguidores.
- c) Como venenos para peces. El efecto que producen en ellos es un adormecimiento o la muerte debido a hemólisis de sus glóbulos rojos. No son tóxicos para el hombre, cuando han sido administrados oralmente.

Ejemplo de estos compuestos puede ser:

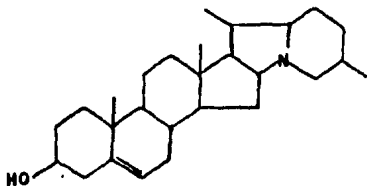


Digitogenina $C_{27}H_{44}O_5$

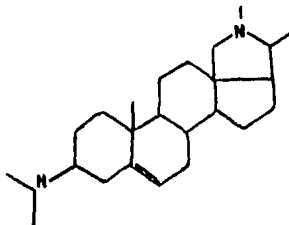
C) Alcaloides: dentro de este grupo de compuestos se tienen algunos con estructura esteroidal. Tienen su origen en el reino vegetal y se encuentran en cortezas de árboles, semillas, arbustos, raíces, frutos y rizomas, de cuatro géneros de plantas que son: Solanum, Kurchi, Jerveratrum y Ceveratrum. Presentan diferentes actividades, entre otras (las que se encuentran principalmente) :

- a) Alto poder antibiótico contra hongos y bacterias.
- b) Actividad contra la disentería amibiana.
- c) Alta actividad hipotensora.

Ejemplos de estos compuestos pueden ser:



Solanidina $C_{27}H_{43}ON$

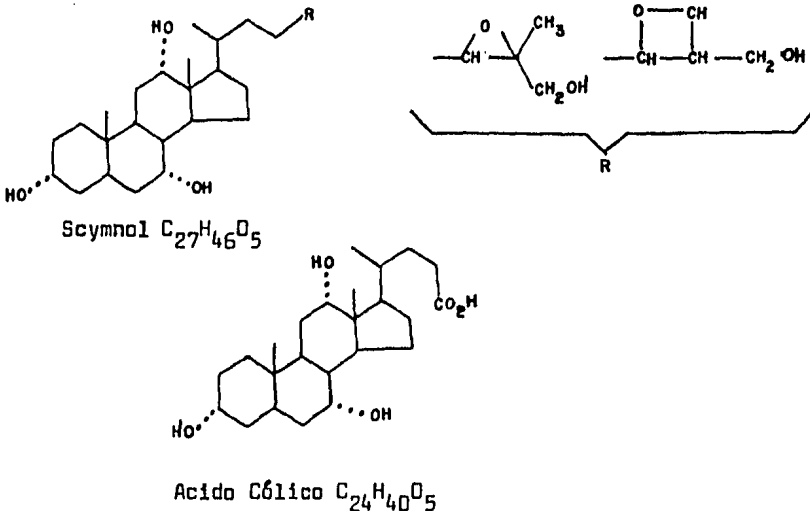


Conessina $C_{24}H_{40}N_2$

D) Alcoholes biliares y Acidos biliares.

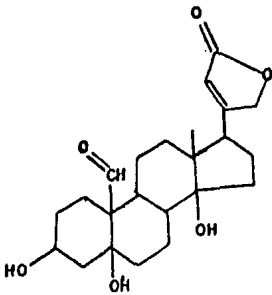
- a) Alcoholes biliares: este tipo de moléculas esteroidales son un sustituto de los ácidos biliares en determinados animales por ejemplo: tiburón, carpa, raya y rana. Este alcohol biliar interviene en el proceso de la digestión.
- b) Acidos biliares: los ácidos biliares se producen en el hígado y se encuentran como molécula esteroidal activa en el líquido biliar. Los principales ácidos biliares son: ácido cólico, ácido desoxicólico y ácido litocólico. Su principal función es reducir la tensión superficial de las grasas durante la digestión.

Ejemplos de estos compuestos pueden ser:

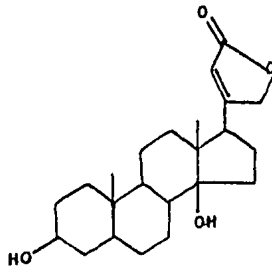


- E) Principios activos cardíacos: este grupo de esteroides está constituido por glucósidos presentes en plantas con alto contenido de glucósidos. Los glucósidos llamados cardíacos se encuentran en pequeñas cantidades en semillas, hojas, tallos, raíces y cortezas, particularmente en plantas del orden Apocynaceae. Los compuestos estrofantidina y digitoxigenina son los aglucosidos más comunes de estos glucósidos. Su principal función es la actividad específica sobre el músculo cardíaco: incrementan la contractilidad del músculo, disminuyen

yen el ritmo y mejoran la eficiencia cardíaca. Ejemplos de estos compuestos pueden ser:



Estrofantidina $C_{23}H_{34}O_6$



Digitoxigenina $C_{23}H_{34}O_4$

F) Hormonas sexuales: las hormonas sexuales son secretadas por las gónadas (ovarios, testículos), bajo estimulación de las hormonas proteínicas. Estas son secretadas por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria y llevadas a las gónadas en el flujo sanguíneo.

Encontramos dos tipos de hormonas sexuales: masculinas y femeninas.

a) Masculinas: las hormonas masculinas son secretadas principalmente por los testículos y en menor cantidad por las células intersticiales del tejido conectivo (corteza suprarrenal). La principal hormona masculina es la testosterona: es un esteroide oxigenado con diecinueve átomos de carbono y pertenece a la serie general de androstano. Sus principales funciones son:

- a.1) Controlar y desarrollar los órganos genitales (vesícula seminal, próstata, vasos deferentes y pene).
- a.2) Definir las características del esperma.
- a.3) Influir sobre la actividad secretoria de glándulas auxiliares.
- a.4) Desarrollar los caracteres sexuales secundarios en el hombre.

b) Hormonas Femeninas: son secretadas por el ovario por conversión de acetil coenzima A a colesterol y subsecuentemente a otros esteroides.

Las hormonas sexuales femeninas se dividen en dos grandes grupos: los estrógenos y los progestágenos.

b.1) Estrógenos: la formación de estrógenos se lleva a cabo en los folículos ováricos y es regulada la secreción por la hormona folículo estimulante (FSH).

Durante el embarazo los estrógenos son sintetizados en grandes cantidades por la placenta. Las principales funciones de los estrógenos son:

- i) Inducir el desarrollo y crecimiento de la vagina, del útero y de las trompas de falopio.
- ii) Inducir el crecimiento de las glándulas mamarias, a través del crecimiento de conductos, estroma y aumento de grasas.
- iii) Contribuir al moldeado de contornos del cuerpo y esqueleto.
- iv) Estimular el crecimiento del pelo púbico y axilar.
- v) Engrosar el endometrio en la primera mitad del ciclo normal menstrual.
- vi) Inducir la pigmentación regional de la piel de las personas y de laaréola de la región genital.

b.2) Progestágenos: en el ovario humano, después que se ha desarrollado y fracturado el folículo, se forma un tejido con abundante caroteno amarillo y por lo cual es llamado cuerpo amarillo o cuerpo lúteo, de éste se secreta la progesterona.

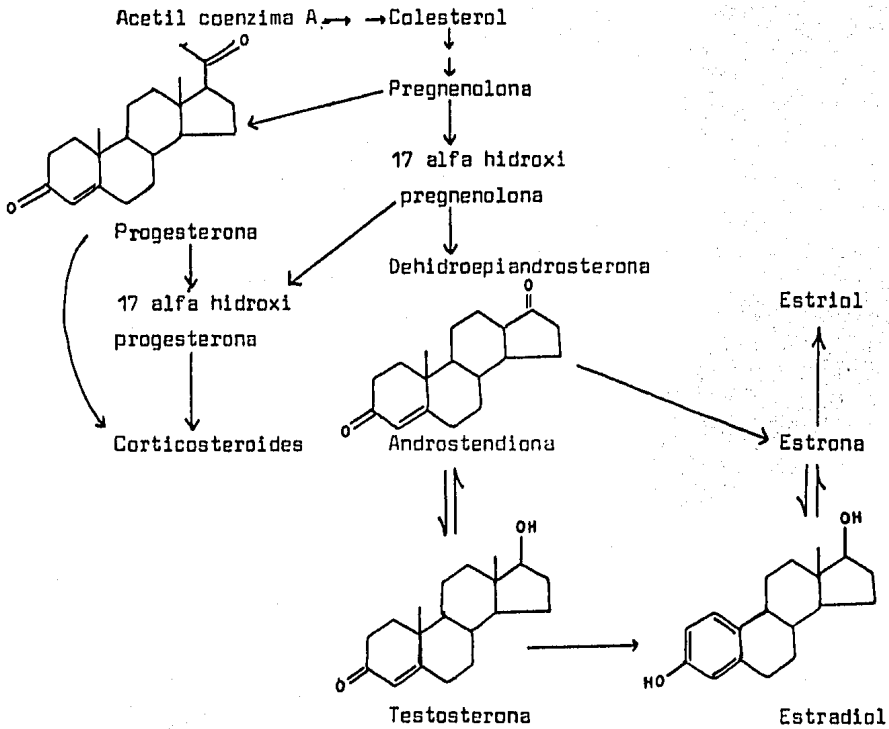
Las principales funciones de los progestágenos son:

- i) Engrosar el endometrio en la segunda mitad del ciclo normal menstrual (fase secretoria), hasta llegar a un estado apropiado para la implantación de un óvulo fecundado.
- ii) Si se lleva a cabo la fertilización:
 - ii.1) Suprime la ovulación.
 - ii.2) Mantiene condiciones esenciales en el útero.
 - ii.3) Inhibe la motilidad uterina.

ii.4) Induce con el estradiol el desarrollo de las glándulas mamarias.

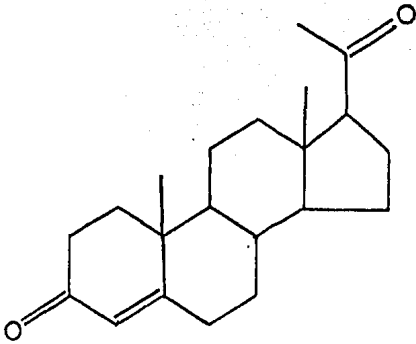
iii) Mantiene y controla el período del embarazo, desde que se implanta el huevo fecundado hasta el nacimiento normal

El siguiente esquema demuestra la vía biosintética de las hormonas sexuales:

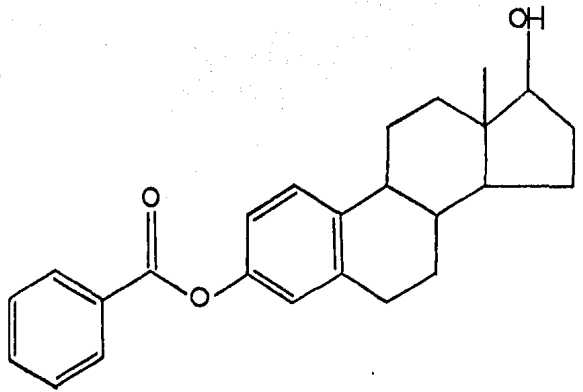


Vía biosintética de las hormonas sexuales

En el presente trabajo se desarrolló un método de análisis para la de terminación de dos hormonas sexuales femeninas que son la progesterona y el benzoato de estradiol, los cuales se encuentran en un medicamento utilizado precisamente para suplir las deficiencias de ellas -- por alteraciones de los sistemas de secreción que las producen.



Progesterona $C_{21}H_{30}O_2$



Benzoato de estradiol $C_{18}H_{23}OOCOC_6H_5$

III GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

III.1 FUNDAMENTO DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de ellas es un lecho estacionario, mientras que la otra fluye sobre o a través del lecho estacionario, llamandose esta fase móvil.

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria, la cual puede ser un sólido o un líquido y del fenómeno que se lleva al cabo. Si la fase estacionaria es un sólido el método es conocido como cromatografía de adsorción; si la fase estacionaria es un líquido se conoce como cromatografía de partición. En cada caso la fase móvil puede ser ya sea un líquido o un gas.

Hay cuatro tipos de cromatografía:

a) Líquido-sólido

" Clásica" Cromatografía de adsorción

Cromatografía en capa delgada.

Cromatografía de intercambio iónico.

b) Gas-sólido

Cromatografía Gas-sólido

c) Líquido-líquido

" Clásica" Cromatografía de partición.

Cromatografía en papel.

d) Gas-líquido

Cromatografía Gas-líquido

Cromatografía columna capilar

La variable central en la teoría cromatográfica, en el caso de ser adsorción o partición es el coeficiente de distribución de una sustancia en las dos fases del sistema bajo prueba. En sistemas de adsorción este coeficiente varía considerablemente con la concentración de la sustancia distribuida y con la temperatura.

Centrandonos en la cromatografía en capa delgada, podemos decir: la capa delgada se compone de material granular colocado sobre un soporte adecuado de vidrio, de metal o una película (fase estacionaria). La muestra a separar, en forma de solución, es aplicada en gotas o bandas (inicio). Después la placa es colocada dentro de una cámara cerrada conteniendo un disolvente (fase móvil). La separación se realiza por migración capilar (desarrollo).

La adsorción de un compuesto en solución sobre una superficie, toma lugar principalmente en la interfase sólido-líquido. En el equilibrio, cuando el número de moléculas ha sido adsorbido en una unidad de tiempo dada, la situación puede ser expresada por la ecuación:

$$a = \frac{C_a}{C_d} \quad \begin{array}{l} C_a = \text{concentración en el adsorbente.} \\ C_d = \text{concentración en el disolvente.} \end{array}$$

donde "a" es igual a la constante de adsorción. El equilibrio es afectado como dijimos anteriormente por la temperatura y la concentración de la solución. Si mantenemos constante la temperatura durante el proceso, entonces la concentración es el único factor al que se le debe prestar el mayor interés o importancia. En general el coeficiente de adsorción no es una constante, pero varía con la concentración de la solución.

Un valor obtenido de la cromatografía en capa delgada y de vital importancia es el Rf (relación al frente del disolvente). Es un valor relativo que se emplea para caracterizar la separación de cada compuesto en un sistema cromatográfico específico.

Cuando se varíe cualquiera de los componentes del sistema (disolvente adsorbente, tipo de desarrollo) el valor de Rf variará simultáneamente. El valor de Rf se puede calcular para cada compuesto por medio de la siguiente igualdad:

$$Rf = \frac{a}{b}$$

a = distancia en mm de la línea de aplicación al centro del compuesto separado.

b = distancia en mm de la línea de aplicación a la altura alcanzada por el disolvente (frente).

Relacionando la constante de adsorción mencionada anteriormente con el valor R_f , encontramos que el valor R_f queda definido por la constante. Mientras mayor sea la atracción del adsorbente sobre el compuesto, mayor será "Ca" y este no será eluido tan fácilmente. El coeficiente de adsorción "a" será mayor y el valor R_f será menor. Ahora si el grado de atracción electrostática que posee el adsorbente sobre el compuesto es muy bajo, este será fácilmente eluido y su concentración en el disolvente "Cd" será mayor que en el adsorbente. El coeficiente de adsorción será menor y consecuentemente el valor de R_f será mayor. Existen dos casos extremos para los valores de R_f , a) cuando la sustancia se disuelve completamente en el eluyente y es arrastrada por él ($R_f = 1$). b) cuando la sustancia se adsorbe completamente al adsorbente, no siendo modificada su situación por el paso del eluyente, se queda en el origen ($R_f = 0$).

Para obtener valores de R_f reproducibles deben tenerse en cuenta las siguientes variables:

- a) Calidad de los adsorbentes.
- b) Grado de actividad de la capa (humedad, humedad del aire).
- c) Espesor de la capa. (elaboración de la misma).
- d) Calidad del eluyente.
- e) Saturación de la cámara.
- f) Técnica.
- g) Trayecto y distancia desde el punto de origen.
- h) Cantidad de muestra.
- i) Sustancias acompañantes.
- j) Temperatura.
- k) Angulo de la placa con respecto a la vertical.
- l) Cantidad de eluyente en el fondo de la cámara.

III.2 ADSORBENTES PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Un adsorbente ideal debe poseer un cierto número de cualidades. Su poder adsorbente debe ser extendido a un gran número de sustancias y su capacidad de adsorción debe ser elevada, para evitar la saturación provocada por las soluciones relativamente diluidas. Es deseable que la fuerza de adsorción del adsorbente sea reproducible y controlable o sea que el grado de activación o desactivación sea siempre el mismo. La adsorción irreversible debe ser la excepción, lo mismo que la formación de sales, lacas, complejos o la catálisis de transformación indeseable de ellos. El adsorbente no debe ser soluble en el disolvente ni tener impurezas que contaminen a la solución.

Es recomendable que el adsorbente sea blanco o un poco coloreado a fin de que por la observación visual, los colores de las zonas o de los reveladores no sean contrarios a un color propio de la sustancia.

Para poder elegir un adsorbente se deben considerar las características de las sustancias que se desean separar: acidez, basicidad, carácter iónico, solubilidad, posibilidades de reacción con el adsorbente o con el disolvente.

En general los compuestos lipófilos se separan sobre óxido de aluminio, gel de sílice, celulosa acetilada y poliamida. Las sustancias hidrófilas se separan con celulosa, celulosa con combinadores de iones, gel de sílice y poliamida. Esta es una guía empírica pues hay excepciones.

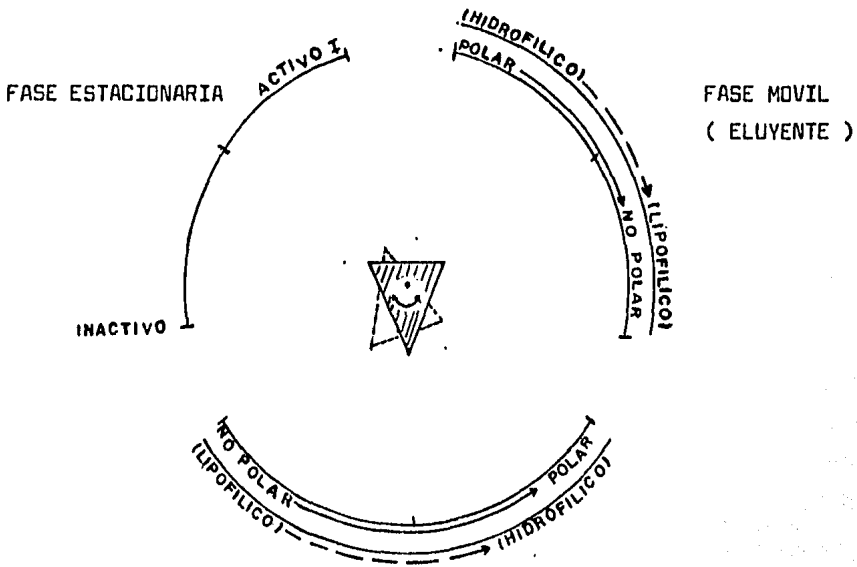
Se considera que la unión entre el adsorbente y la sustancia adsorbida (adsorbato) se realiza por fuerzas electrostáticas, las cuales también son responsables de la red cristalina. Por las tensiones eléctricas superficiales se inducen momentos dipolares ya existentes en combinaciones polares. Así pues, la unión del adsorbato a la superficie del medio de adsorción, esta producida por fuerzas ión-dipolo o dipolo-dipolo respectivamente. Los puentes de hidrógeno

no participan a menudo de la unión adsorbente-adsorbato. El contenido de agua que posee un adsorbente tiene un significado decisivo, ya que las moléculas de agua fácilmente adsorbidas bloquean los puntos activos de la superficie. El poder adsorbente varía dentro de grandes límites dependiendo del tratamiento - que puedan sufrir. Siendo estos tratamientos activantes o desactivantes.

La activación de los adsorbentes resulta de la disminución de la cantidad de agua adsorbida por el adsorbente, y la desactivación es la operación inversa, es decir el aumento de la cantidad de agua fijada en los centros activos. El agua libre es aquella que se puede fijar o eliminar reversiblemente, por oposición al agua de constitución, ya que la eliminación irreversible de esta ocasiona una modificación progresiva de la estructura del adsorbente con desaparición de sus propiedades adsorbentes. Algunos métodos para lograr un control del agua libre, los encontramos en la cita bibliográfica No 8 .

El adsorbente, el eluyente y la mezcla a separar deben tener una correlación la cual se puede sintetizar con el diagrama triangular que se representa en la fig. No 2 . Imaginándose que el triángulo puede ser rotado, a una mezcla de lípidos que serán separados, un vértice del triángulo apunta hacia la palabra "lipofílico" en "mezcla por separar" (indicado con el triángulo punteado en el diagrama), el segundo vértice punteado muestra que la fase móvil (disolvente) es no polar y que requiere de una fase estacionaria activa (adsorbente). Opuestamente, para una mezcla polar a separar, los vértices apuntan hacia la palabra disolvente hidrofílico y hacia un adsorbente inactivo.

Por último al referirnos a los adsorbentes, algunos de ellos contienen en su formulación aglutinantes. Su objeto principal es retener la capa del adsorbente sobre la placa. El más común es el yeso que se añade de un 10 % a un 15 % . Otro aglutinante es el almidón y su concentración es de 1 % a 3 % .



MEZCLA A SEPARAR

Fig. No 2

III.3 LOS DISOLVENTES EN CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

Caracterización del poder eluyente de los disolventes.

Este depende de la naturaleza del disolvente y su concentración, del adsorbente, del soluto y de la temperatura. Después con todo rigor se pueden comparar los disolventes entre sí, esto procede de la experiencia manteniendo constantes los tres últimos factores. Mediante lo cual se puede utilizar la velocidad relativa R_f y estudiar, (por ejemplo) de este modo lo que ha hecho Bickoff; la variación del R_f con respecto a la concentración del agente eluyente, de esta manera podemos redactar una tabla de las fuerzas eluyentes relativas para una misma concentración del agente eluyente.

Le Rosen ha estudiado de este método las mezclas binarias y terciarias. La variación del R_f con respecto a estas mezclas no es siempre lineal y frecuentemente al contrario de la fuerza de elución, ya que es exaltado por la mezcla de dos disolventes, la elución es más pronunciada para una mezcla de disolventes que con cada uno de los componentes de la mezcla. La clasificación de los disolventes según su poder eluyente depende del método experimental utilizado por el investigador. Esta clasificación se ha hecho por series.

Numerosos trabajos tienen dependencia entre sí, esto se remarca por el hecho de que su forma de clasificación no manifiesta diferencias significativas, teniendo en cuenta los criterios bajo los cuales cada serie tiene su fundamento. Estos criterios pueden incluir propiedades tales como la solubilidad en el agua, el calor específico de humectación de diversos adsorbentes, las tensiones superficiales, las constantes dieléctricas y los momentos dipolares.

Sin entrar en detalles de las consideraciones que tienen motivo para el establecimiento de las series, ni de aquellas interacciones que pueden ser responsables de la elución, aquí únicamente se reproduce la serie de Wohlleben. Este autor relaciona el poder eluyente a la polaridad de los disolventes, de tal forma que

de acuerdo a su carácter polar es posible darles un orden determinado.

SERIE ELUOTROPICA SEGUN WOHLLEBEN

$\epsilon - 20 \text{ C}$

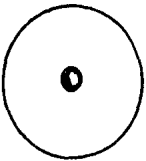
n-Pentano	
Eter de petróleo	
n-Hexano	1.89
n- Heptano	1.92
Ciclohexano	2.02
Tetracloruro de carbono	2.24
Tricloro etileno	2.26
Benceno	2.28
Diclorometano	3.15
Cloroformo (libre de alcohol)	4.34
Eter dietílico	4.80
Acetato de etilo	6.02
Piridina	12.03
n-Butanol	19.20
Acetona	20.70
n-Propanol	22.30
Etanol	24.30
Metanol	33.62
Agua	80.37
Acidos orgánicos	
Mezclas de ácidos-bases-agua	
Alcoholes o piridina	

La extrema sensibilidad de la cromatografía, con toda la variación de condiciones experimentales, nos obliga a utilizar los disolventes purificados. Una impureza, en pequeñas trazas, por ejemplo, etanol presente en cloroformo como estabilizador, puede conducir a trastornos profundos dentro de los valores de R_F . Con lo anterior debemos considerar dos puntos al respecto de -- los disolventes. En primer lugar los disolventes, deben ser anhidros o contener una cantidad de agua controlada; el agua siendo un agente eluyente poderoso, presente en trazas variables --

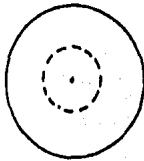
puede perturbar los cromatogramas, como fué indicado en el capítulo anterior. En segundo lugar el disponer de un disolvente recuperado, debe ser precedido de un tratamiento especial para eliminar cuidadosamente el agente eluyente que pudo ser utilizado. Los componentes de una mezcla de disolventes no tienen la misma afinidad en adsorción para un adsorbente. Este fenómeno se observa durante el desarrollo de una cromatoplaqa, donde se utiliza - un sistema con diferente constante dieléctrica.

Los disolventes menos polares penetran en el adsorbente rápidamente y constituyen una fase estacionaria. Los disolventes más polares corren lentamente como una fase móvil y forman un segundo frente visible. Un método sencillo para determinar el disolvente o la mezcla de disolventes a utilizar en una cromatografía es el siguiente:

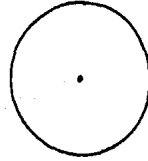
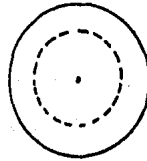
1. Utilizar una placa (gel de sílice o celulosa) de 5 x 7.5 cm .
2. Aplicar en forma de punto (gota) con diámetro de 2 cm .
3. Aplicar de 0.1 a 0.2 ml de disolvente, en el centro de cada problema, (difusión por capilaridad).
4. Observar para cada disolvente utilizado el poder de resolución. Este se observa por el desplazamiento de la mancha del punto de aplicación a la zona de difusión radial del disolvente aplicado.



Poder de resolución pobre o nulo.



Poder de resolución adecuado.



Poder de resolución pobre.

III.4 RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS ESTEROIDES Y SU COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO.

1. La solubilidad en la fase móvil poco polar es función de la naturaleza hidrocarbonada de los esteroides: así los esteroides -- con veintidós átomos de carbono son más solubles y de menor polaridad que los esteroides con diecinueve átomos de carbono.
2. Son las funciones oxigenadas las que determinan la fuerza de los enlaces entre las sustancias disueltas y la fase polar estacionaria (enlaces hidrógeno). También se pueden distinguir (dentro del sistema propanediol-bencina de petróleo) cuatro categorías de esteroides.
 - a) Los esteroides mono-oxigenados (monohidroxilados o monocetónicos), son poco polares y de gran movilidad, por lo cual es difícil separarlos unos de otros.
 - b) Los esteroides dicetónicos no pueden separarse satisfactoriamente por éste sistema.
 - c) Los esteroides dioxigenados, monohidroxilados-monocetónicos son bien separados entre ellos por éste sistema. Para los esteroides monohidroxilados-dicetónicos y los esteroides tricetónicos el poder de resolución en éste sistema es menor, pero se logra la separación entre ellos.
 - d) Los esteroides trioxigenados (dihidroxi-mono cetónicos), tetra oxigenados y con mayor razón los penta-oxigenados, son considerablemente difíciles de separar por éste método.

Un análisis de las funciones nos dice que la función hidroxilo es más polar que los grupos cetónicos. En medio de éstas últimas las cetonas conjugadas son más polares que las cetonas de los compuestos saturados y los grupos cetona-dieno conjugados son aún más polares.
3. El grupo alcohol primario en C₂₁ es el menos polar; el enlace hidrogeno interno que se une a éste hidroxilo con la cetona en C₂₀ es probablemente el responsable de éste fenómeno, que consiste en disminuir los enlaces de la molécula con el disolvente estacionario; de esto que el hidroxilo en C₂₁ tiene un menor efecto

to de frenado que aquellos hidroxilos en C₁₇ ó C₁₁ ya que tienen impedimento estérico.

4. Si se compara el efecto polar de los hidroxilos secundarios fijos sobre un mismo átomo de carbono ya sea posición alfa o beta, podemos decir que los isómeros 6 alfa, 7 beta, 11 alfa, 17 beta son más polares que los isómeros 6 beta, 7 alfa, 11 beta, 17 alfa correspondientes.

Otro factor que influye la polaridad de los esteroides hidroxílicos, es la posición del hidroxilo en el esqueleto. Para una posición ecuatorial o axial dada, un 6-hidroxiesteroide es más polar que el 11-hidroxiesteroide correspondiente. Tomando ésta idea podemos predecir las características de éste o aquel grupo químico colocado en una posición sobre la molécula.

Sin embargo modificaciones complejas de la molécula pueden variar las características de los esteroides de la misma polaridad; por ejemplo, el aumento de una función hidroxilo sobre un esteroide puede ser el mismo aumento de polaridad que dos funciones cetónicas; otro ejemplo se presenta al retirar un grupo hidroxilo el cual disminuye la polaridad en el mismo valor que la adición de cinco grupos metilo.

Un sustituyente en posición tres con una configuración axial (3 beta cis; 3 alfa trans) exhibe mayor movilidad que la configuración ecuatorial (3 alfa cis; 3 beta trans). La naturaleza del sustituyente en C-3 influye en el orden de elución y el grado de separación de los 5 alfa y 5 beta epímeros. Estos resultados están en concordancia con el comportamiento de los esteroides con C₁₉ en cromatografía en capa delgada y se confirma la movilidad en cromatografía en papel.

En general los grupos químicos pueden clasificarse de forma sistemática de mayor a menor polaridad, como sigue:

carbonilo > hidroxilo > aldehido > cetona > éster > éter > doble ligadura >

ligadura simple

Para algún tipo de disolvente el efecto de un sustituyente en una posición y orientación dadas es altamente característico, en términos de R_f , cuando es comparado con otras posiciones y orientaciones, independientemente del tipo de esteroide en el cual ha sido introducido el grupo. Se debe tomar el significado de "grupo" - no solamente como hidroxilo, carbonilo, carboxílico, etc. primario o secundario, sino además por la posición y orientación.

Esta teoría tiene una justificación, ya que los efectos estéricos son más pronunciados en los esteroides que en cualquier otra familia de compuestos orgánicos. El núcleo esteroidal consiste de cuatro anillos rígidamente unidos donde no hay la posibilidad de una inversión conformacional y sólo existe una posibilidad relativamente pequeña de conformación curvada. Aún más, la extensión del sistema de anillos provee una gran área del esqueleto hidrocarbonado para interactuar con las moléculas del disolvente por fuerzas de Van Der Waals. La relativa rigidez de este esqueleto y el corto valor de estas fuerzas, hace que las interacciones sean más sensibles a factores estéricos a diferencia de las moléculas en las cuales puede presentarse la rotación específica y otros cambios conformacionales de baja diferencia energética.

III.5 METODOS USUALES DE DETECCION PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

A) Métodos Químicos: este tipo de detecciones tiene el inconveniente de inutilizar el compuesto para cualquier análisis posterior. Este se basa en reacciones químicas generales o específicas que ocurren entre el compuesto separado y un reactivo químico.

El reactivo químico puede ser aplicado por espersión o por exposición a vapores o gases. En ocasiones, para completar la reacción, hay que calentar cuidadosamente la cromatoplaça, aproximadamente entre 100 - 110 grados centígrados por algún tiempo.

La técnica de aspersion deberá realizarse a 30 cm de la cromatoplaça, con esto se evita aplicar demasiado reactivo, ya que el exceso hará que se difundan o se corran las manchas.

En la técnica de exposición a vapores o gases, es indispensable utilizar una cámara cerrada y bajo una campana de extracción. - La tabla No 1 define el uso del reactivo y el aspecto de las manchas.

METODOS QUIMICOS		
REACTIVO	COMPUESTO DETECTADO	ASPECTO DE LA MANCHA
1. H_2SO_4 al 50 %	esteroides: progesterona y benzoato de estradiol.	Rosa y amarillo respectivamente al calentar a 110 grados C.
2. $Sb Cl_3$, $Sb Cl_5$	Esteroides y vitaminas liposolubles.	varios colores.
3. Hidrazina del ácido isonicotínico.	esteroides	observar bajo luz UV.
4. Reacción de Boute.	estrógenos con grupo fenol.	amarillo
5. Anisaldehído en H_2SO_4 y ácido acético.	esteroides	varios tonos de azul.
6. Tricloruro de antimonio en $CHCl_3$ con anhídrido acético.	esteroides y glicosidos esteroidales	varios colores.
7. Acido o-fosfórico y ácido fosfomolibdico.	esteroides	azul - verde
8. Cloruro de 2,3,5 - trifenil tetrazolio	esteroides, azúcares reductores, glicósidos.	manchas rojas.
9. Vainillina - H_3PO_4	esteroides	varios colores.

Tabla No 1

B) Métodos Físicos: sustancias orgánicas con dobles ligaduras con jugadas o aromáticas absorben luz UV entre 240 y 260 nm (luz de onda corta), produciendose colores característicos. En otros casos hay sustancias orgánicas que al hacerlas pasar por luz UV

a 360 nm presentan fluorescencia.

Para incrementar la sensibilidad en la detección de los compuestos separados en placa, se adiciona al adsorbente un compuesto fluorescente, de tal modo que cuando la placa se irradia con luz UV, las zonas ocupadas por el compuesto se observan como manchas oscuras. Por este método no se altera el compuesto separado.

IV PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 DESARROLLO DEL METODO.

Esta sección fué estructurada de la siguiente forma:

- A) Para iniciar el estudio y con ello la posibilidad de alcanzar el objetivo, primeramente se realizó una revisión bibliográfica sobre los componentes del inyectable:

Prop. Físicas	Progesterona	B. Estradiol
1. Solubilidad		
agua	-	-
metanol	+	+
etanol	+	+
acetona	+	+
cloroformo	+	+
2. Punto de Fusión	121 ^o C	191 - 196 ^o C
3. Rot. Específica	+172 a +182	+ 58 a + 63
4. Max. absorbancia	240 nm en metanol	232 nm en etanol absoluto
5. Estructura	consultar pag. 14	consultar pag. 14
6. Peso molecular	314.24	376.2
7. Estruct. Molecular	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	C ₁₈ H ₂₃ OCOOC ₆ H ₅

- B) Como segundo paso se realizó una evaluación y elección del método analítico, tomando como criterio:
1. Pocas manipulaciones de la muestra desde el inicio hasta el final del análisis.
 2. Que sea fácilmente identificable.
 3. Que sea reproducible.
 4. Que sea preciso.
 5. Tiempo reducido de análisis.
 6. Que no requiera la adquisición de equipo nuevo.

Se elige la cromatografía en capa delgada, porque cumple con estos --

requerimientos por las siguientes razones:

- a) Por este método se realizan operaciones muy seguras, para obtener la separación de los dos compuestos.
- b) Se identifican fácilmente los compuestos por medio del R_f , sin ser dañados.
- c) Cuando se ha seleccionado el adsorbente y el disolvente, el método es reproducible y preciso.
- d) El tiempo requerido para realizar el análisis es relativamente reducido.
- e) Se requiere equipo sencillo para su realización.

C) Continuando con el desarrollo se eligió el adsorbente idóneo, teniendo como base el estudio del capítulo III.2 . Se elige para este método, gel de sílice tipo 60 F₂₅₄, la cual no contiene yeso ni aglutinante orgánico, contiene un indicador luminiscente inorgánico no eluible, que excitado con luz UV de onda corta (para este caso), presenta fluorescencia intensa, de esta forma se puede identificar cada uno de los compuestos sin problema.

D) El eluyente constituye la parte que nos termina de definir el método de separación de los compuestos. En este punto es necesario realizar pruebas como indica el capítulo III.3 . El utilizar uno u otro disolvente o una mezcla, fué en función de la polaridad. Para esto se tomó como base la serie eluotrópica de Wohlleben. Finalmente la mezcla con la que se obtuvo mejor resultado, fué bencina de petróleo:acetona (4:1), con doble desarrollo en la misma dirección. Una observación de gran importancia para mejorar los resultados, fué la forma de aplicar la muestra en la placa. La aplicación en banda da mejor poder de resolución que la aplicación en punto.

E) Una vez separados los componentes de la solución problema, se determinó cuantitativamente cada uno de ellos. Esta determinación se realiza espectrofotométricamente.

F) Como última parte fué validado el método. De esta manera se recono

ció que el método es reproducible, preciso y exacto. Se realizó a tres concentraciones (80%, 100%, 120%). Finalmente se repitió el método veinte veces con muestra problema.

Se determinaron los valores estadísticos siguientes:

- a) El valor medio aritmético (\bar{x}).
- b) La desviación estandar (s).
- c) El intervalo de confianza (IC).
- d) El coeficiente de variación (CV).

Un promedio es un valor que es típico o representativo de un conjunto de datos. Como tales valores tienden a situarse en el centro del conjunto de los datos ordenados según su magnitud, los promedios se conocen como medidas de centralización.

La desviación estandar es una medida de dispersión, la información que nos proporciona es la variabilidad o dispersión del conjunto de datos en una distribución normal de frecuencias.

El intervalo de confianza, se refiere a la probabilidad de que un valor esté comprendido entre $- 1.96 S\bar{x}$ y $+ 1.96 S\bar{x}$ y esta variación sea del 95%. Con este valor estadístico, la medida de exactitud de un método analítico queda definida.

El coeficiente de variación expresa (en porciento) la desviación del método y con ello, reconocemos la precisión o reproducibilidad.

IV.2 PROCEDIMIENTO

1. Preparar una cámara para cromatografía en capa delgada con papel filtro, colocando en forma de U dentro de la cámara. Y adicionar solución de bencina de petróleo : acetona (4:1). La solución deberá cubrir un mínimo de 5 mm .
2. Tapar la cámara y esperar un tiempo mínimo de 2 horas (tiempo de saturación).
3. Preparar una solución estándar de progesterona a una concentración de 5mg / ml .

4. Preparar una solución estándar de benzoato de estradiol a una concentración de 0.5 mg / ml .
5. Aplicar (en banda de 5 cm de longitud y a una altura de 1.5 cm de la orilla inferior de la placa) 0.1 ml de solución estándar de progesterona.
6. Aplicar en el mismo sitio señalado en el punto anterior 0.1 ml de solución estándar de benzoato de estradiol.
7. Aplicar (dejar un espacio de 2 cm) en banda de 5 cm de longitud, 0.1 ml de solución problema.
8. Marcar una línea a 15 cm de las aplicaciones descritas en los puntos anteriores.
9. Introducir la placa en la cámara y esperar que el eluyente ascienda.
10. Retirar la placa de la cámara cuando el eluyente llegue a la marca de 15 cm . Dejar evaporar el disolvente de la placa.
11. Repetir los puntos 9. y 10.
12. Observar bajo luz UV a longitud de onda de 254 nm y enmarcar las manchas de cada una de las hormonas tanto en el estándar como en el problema. Para la progesterona se obtuvo experimentalmente un $R_f = 0.308$ y para el benzoato de estradiol el $R_f = 0.224$
13. Raspar cada una de las manchas y depositar el polvo de cada una de ellas en tubos para centrifuga.
14. Adicionar 5 ml de metanol a cada uno de los tubos correspondientes a la progesterona (estándar y problema).
15. Adicionar 2 ml de etanol absoluto a cada uno de los tubos correspondientes al benzoato de estradiol (estándar y problema).
16. Agitar cada tubo con agitador vibratorio y centrifugar durante 10 minutos.
17. Transferir el disolvente que contiene la progesterona a un matraz aforado de 50 ml .
18. Transferir el disolvente que contiene el benzoato de estradiol a un matraz aforado de 10 ml .
19. Repetir cuatro veces los puntos del 14. al 18. , reuniendo las soluciones obtenidas con cada extracción en los correspondientes matraces aforados.
20. Llevar al aforo con metanol en cada uno de los matraces que co-

- responden a la progesterona (estándar y problema).
21. Llevar al aforo con etanol absoluto en cada uno de los matraces que corresponden al benzoato de estradiol (estándar y problema).
22. Determinar espectrofotométricamente la concentración de cada una de las hormonas en la siguiente forma:
- a) Progesterona.
- a.1 Ajustar el equipo a cero con metanol a una longitud de onda de 240 nm .
- a.2 Determinar la absorbancia de la solución estándar a la misma longitud de onda (A_{stp}).
- a.3 Determinar la absorbancia de la solución problema a la misma longitud de onda (A_{pp}).
- b) Benzoato de estradiol.
- b.1 Ajustar el equipo a cero con etanol absoluto a una longitud de onda de 232 nm .
- b.2 Determinar la absorbancia de la solución estándar a la misma longitud de onda (A_{ste}).
- b.3 Determinar la absorbancia de la solución problema a la misma longitud de onda (A_{pe}).
23. Calcular la concentración de cada hormona como sigue:
- a) Progesterona
- $$\frac{A_{pp}}{A_{stp}} \times \text{Título del estándar de progesterona} \times 0.5$$
- en por ciento
- b) Benzoato de estradiol
- $$\frac{A_{pe}}{A_{ste}} \times \text{Título del estándar de B. de estradiol} \times 0.05$$
- en por ciento.
- Título de la progesterona utilizada como estándar = 100.9 %
- Título del B. de estradiol utilizado como estándar = 98.3 %

IV.3 MATERIAL Y EQUIPO

Espectrofotómetro Bausch + Lomb 2000 o equivalente, equipado con

celdas de 1 cm de espesor.

Centrífuga.

Cámara cromatográfica de 30 x 28 x 9 cm .

Gabinete oscuro equipado con fuente de luz UV de 254 nm .

Placas de vidrio de 20 x 20 cm con una capa de gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ .

Agitador mecánico.

Pipetas volumétricas de 100 microlitros.

Matraces volumétricos de 50 y 10 ml .

V RESULTADOS Y VALIDACION DEL METODO

Con el objeto de determinar la linealidad del método, así como la precisión y exactitud, se hicieron determinaciones adicionando diferentes concentraciones de cada uno de los componentes y se determinó el % de recuperación.

V.1.1 Resultados de progesterona

Determ N	mg Adicionados	mg Encontrados	% Recuperado
1	40	39.48	98.7
2	40	40.14	100.4
3	40	40.84	102.1
4	40	41.79	104.5
5	50	50.62	101.2
6	50	49.32	98.6
7	50	50.11	100.2
8	50	49.85	99.7
9	60	58.57	97.6
10	60	59.06	98.4
11	60	59.29	98.8
12	60	58.90	98.2

V.1.2 Validación del método para progesterona.

Concentración al 80% de Progesterona

X (% Recuperado)	Perical (X - \bar{X}) ²	Total (X - \bar{X}) ²
98.7	7.39	1.69
100.4	1.04	0.16
102.1	0.46	4.41
104.5	9.48	20.25
\bar{X} =	101.42	18.37
S^2 =	6.12	$S = 2.47$
		$S_{\bar{X}} = 1.426$

$$IC_{95\%} = \pm 4.53$$

$$CV \% = 2.43$$

Concentración al 100% de Progesterona

X (% Recuperado)	Parcial (X - \bar{X}) ²	Total (X - \bar{X}) ²
101.2	1.64	1.44
98.6	1.74	1.96
100.2	0.08	0.04
99.7	0.05	0.09
$\bar{X} =$ 99.92	3.51	3.53
$S^2 =$ 1.17	$S =$ 1.08	$S_{\bar{X}} =$ 0.623
$IC_{95\%} = \pm$ 1.98	$CV \% =$ 1.08	

Concentración al 120 % de Progesterona

X (% Recuperado)	Parcial (X - \bar{X}) ²	Total (X - \bar{X}) ²
94.8	7.56	27.04
98.4	0.72	2.56
98.8	1.56	1.44
98.2	0.42	3.24
$\bar{X} =$ 97.55	10.26	34.28
$S^2 =$ 3.42	$S =$ 1.85	$S_{\bar{X}} =$ 1.07
$IC_{95\%} = \pm$ 3.4	$CV \% =$ 1.89	
Total	Total	Total
$\bar{X} =$ 99.86	$S =$ 2.42	$S_{\bar{X}} =$ 0.699

$$IC_{95\%} = 99.86 \pm 1.54$$

La exactitud la define el intervalo de confianza al 95%. El método es exacto, un poco menos al disminuir la concentración.

$$CV \% = 2.42$$

La precisión la define el coeficiente de variación. El método es preciso, un poco menos al disminuir la concentración.

V.2.1 Resultados del Benzoato de Estradiol

Determ N	mg Adicionados	mg Encontrados	% Recuperado
1	4	4.23	105.75
2	4	4.34	108.50
3	4	4.43	110.75
4	4	4.41	110.30
5	5	4.90	98.00
6	5	4.87	97.40
7	5	5.03	100.60
8	5	4.95	99.00
9	6	5.87	97.90
10	6	5.91	98.48
11	6	6.13	102.20
12	6	5.91	98.48

V.2.2 Validación del método para Benzoato de Estradiol

Concentración al 80% de Benzoato de Estradiol

X (% Recuperado)	Parcial (X - \bar{X}) ²	Total (X - \bar{X}) ²
105.75	9.42	33.06
108.50	0.10	72.25
110.75	3.72	115.56
110.30	2.19	106.09
$\bar{X} =$	108.82	15.43
$S^2 =$	5.14	$S = 2.27$
$IC_{95\%} =$	4.16	$S_{\bar{X}} = 1.31$
		CV % = 2.08

Concentración al 100% de Benzoato de Estradiol

X (% Recuperado)	Parcial (X - \bar{X}) ²	Total (X - \bar{X}) ²
98.00	0.56	4.00
97.40	1.82	6.76
100.60	3.42	0.36
99.00	0.06	1.00
\bar{X} = 98.75	5.86	12.12
S^2 = 1.95	$S = 1.396$	$S_{\bar{X}} = 0.806$
$IC_{95\%} = \pm 2.56$	$CV \% = 1.41$	

Concentración al 120% de Benzoato de Estradiol

X (% Recuperado)	Parcial (X - \bar{X}) ²	Total (X - \bar{X}) ²
97.90	1.85	4.41
98.48	0.61	2.31
102.20	8.64	4.84
98.46	0.64	2.37
\bar{X} = 99.26	11.74	13.93
S^2 = 3.91	$S = 1.98$	$S_{\bar{X}} = 1.143$
$IC_{95\%} = \pm 3.63$	$CV \% = 1.99$	
Total	Total	Total
\bar{X} = 102.28	$S = 5.66$	$S_{\bar{X}} = 1.63$

$$IC_{95\%} = 102.28 \pm 3.53$$

La exactitud la define el intervalo de confianza al 95%. El método es exacto, un poco meos al disminuir la concentración.

$$CV \% = 5.53$$

La precisión la define el coeficiente de variación. El método es preciso, un poco menos al disminuir la concentración.

V.3 EVALUACION DE REPRODUCIBILIDAD.

Por último dentro de éste proceso de validación del método se realizaron determinaciones en diferentes muestras del producto inyectable.

V.3.1 Progesterona.

Muestra No	Contenido teórico en mg	mg Encontrados	% Recuperado	$(X - \bar{X})^2$
1	50	50.09	100.18	0.21
2	50	49.57	99.14	0.34
3	50	49.83	99.66	0.00
4	50	49.92	99.84	0.01
5	50	50.62	101.24	2.31
6	50	50.93	101.86	4.58
7	50	49.85	99.70	0.00
8	50	49.32	98.64	1.17
9	50	50.11	100.22	0.25
10	50	48.73	97.46	5.10
11	50	50.50	101.00	1.64
12	50	51.02	102.04	5.38
13	50	49.64	99.28	0.19
14	50	49.44	98.88	0.70
15	50	49.84	99.68	0.02
16	50	49.63	99.26	0.21
17	50	48.98	97.96	3.10
18	50	49.95	99.90	0.03
19	50	49.48	98.96	0.58
20	50	49.81	99.62	0.01
		$\bar{X} = 49.86$	99.72	25.83

$$s^2 = 1.36 \quad s = 1.166 \quad s_{\bar{x}} = 0.261 \quad IC_{95\%} = \pm 0.545$$

$$CV \% = 1.169$$

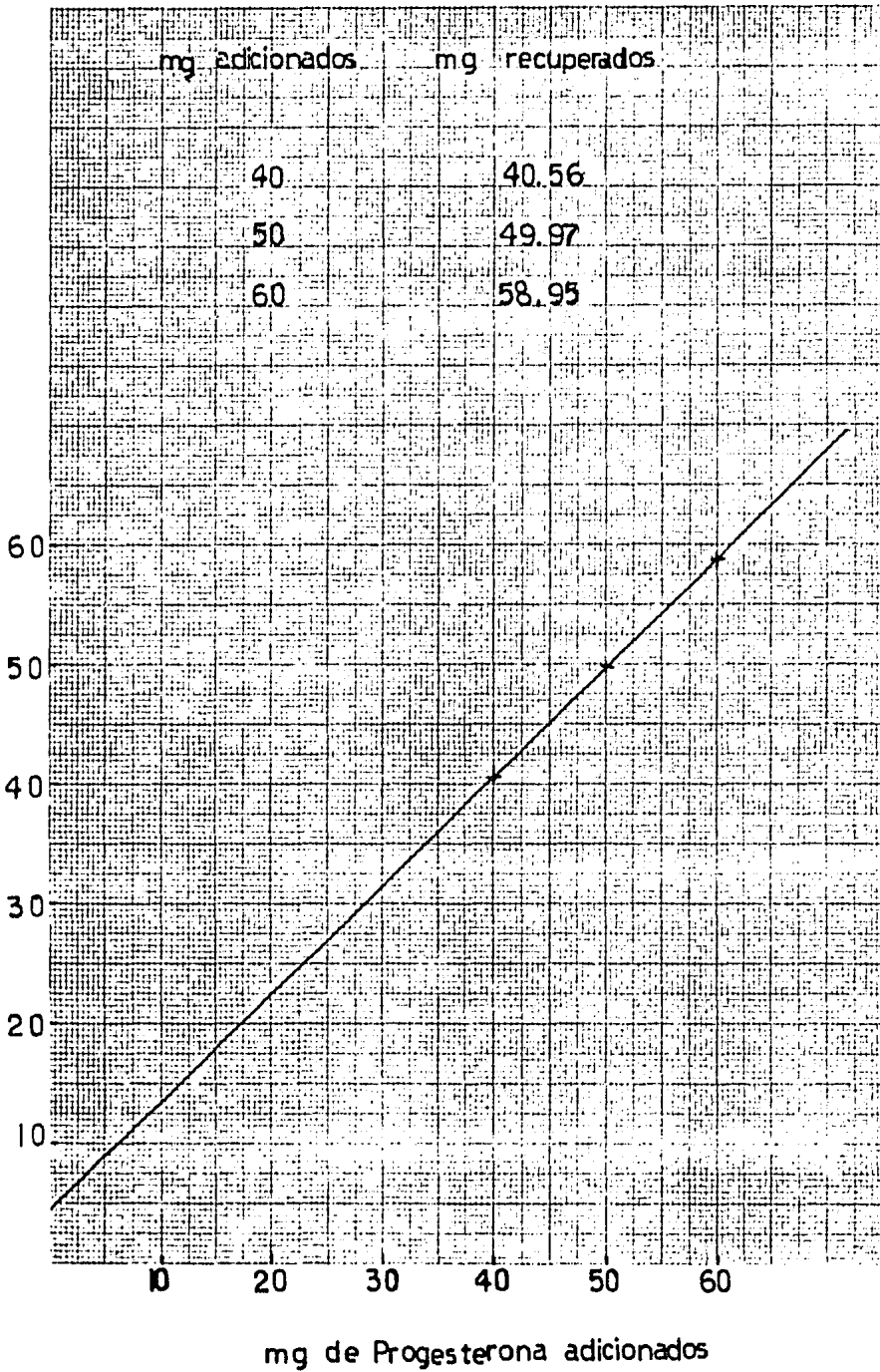
V.3.2 Benzoato de Estradiol

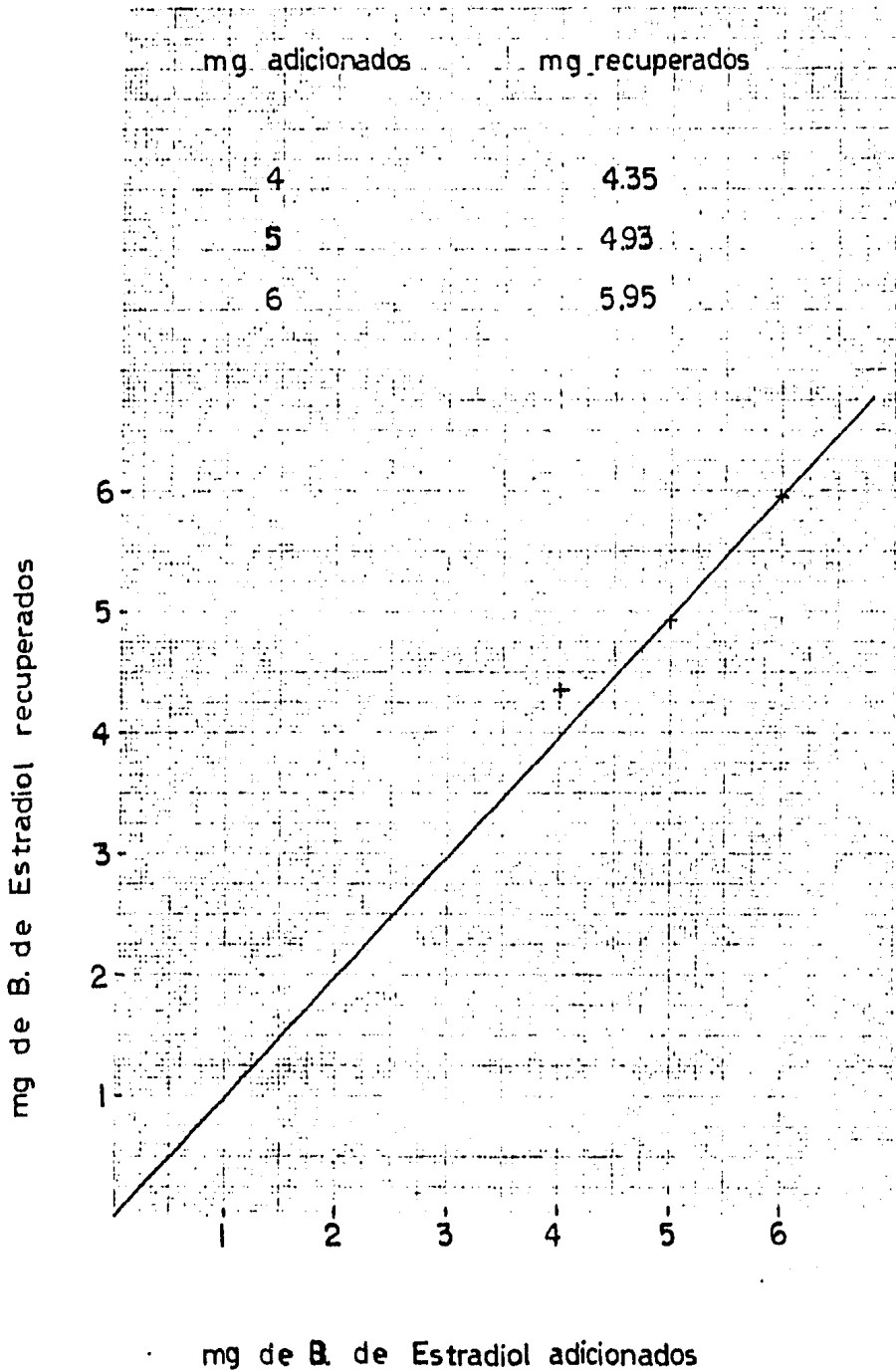
Muestra No	Contenido Teórico en mg	mg Encontrados	% Recuperado	$(X - \bar{X})^2$
1	5	4.98	99.6	1.02
2	5	4.87	97.4	1.42
3	5	5.03	100.6	4.04
4	5	4.85	97.0	2.53
5	5	4.89	97.8	0.62
6	5	4.82	96.4	4.80
7	5	4.94	98.8	0.04
8	5	4.86	97.2	1.93
9	5	5.04	100.8	4.88
10	5	4.91	98.2	0.15
11	5	4.83	96.6	3.96
12	5	4.95	99.0	0.17
13	5	4.89	97.8	0.62
14	5	5.02	100.4	3.28
15	5	4.94	98.8	0.04
16	5	4.92	98.4	0.04
17	5	4.88	97.6	0.98
18	5	5.08	101.6	9.06
19	5	4.98	99.6	1.02
20	5	4.91	98.2	0.15

$$\bar{X} = 4.9295 \quad 98.59 \quad 40.75$$

$$s^2 = 2.14 \quad s = 1.46 \quad s_{\bar{x}} = 0.326 \quad IC_{95\%} = \pm 0.68$$

$$CV \% = 1.48$$





VI CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que el método es preciso y exacto ya que los datos de coeficiente de variación e intervalo de confianza para cada una de las técnicas de valoración de los principios activos se encuentran dentro de intervalos de aceptabilidad, lo que se puede observar en los resultados.
2. La técnica para la valoración de progesterona presenta linealidad, lo que indica que es aplicable para la determinación de diferentes concentraciones de este principio activo.
3. La técnica para la valoración de benzoato de estradiol presenta linealidad a concentraciones altas (5 - 6 mg / ml) en cambio a concentraciones inferiores a 4 mg / ml no la presenta.
4. El método para valorar ambos principios activos es reproducible, como lo podemos observar en los resultados obtenidos.
5. El método puede ser utilizado en control en proceso ya que el tiempo requerido para desarrollar el análisis de los dos principios activos es reducido.
6. Por las conclusiones anteriores se puede decir que el método es confiable para el control de calidad de este producto.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Bush I. Elcock
THE CHROMATOGRAPHY OF STEROIDS
Pergamon Press, New York, Oxford, London, Paris
1961
2. Stahl E.
THIN LAYER CHROMATOGRAPHY
Springer - Verlag, New York, Inc.
1969
3. Stahl E.
DRUG ANALYSIS BY CHROMATOGRAPHY AND MICROSCOPY
Ann Arbor Science, Michigan
1973
4. Fieser L. and Fieser M.
STEROIDS
Reinhold Publishing Corp., New York.
1959
5. Goodman and Gilman
LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA
Macmillan Publishing Corp., Inc.
Sexta edición
1980
6. Jayle M. F.
ANALYSE DES STEROIDES HORMONAUX
Tome 1 Méthodes Générales
Masson et C^{ie}, editeurs
1961

7. Litter, M.
FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL Y CLINICA.
Editorial Ateneo, México etal.
Quinta edición
1975
8. Lederer, E.
CHROMATOGRAPHIE EN CHIMIE ORGANIQUE ET BIOLOGIQUE
Masson et C^{ie}, editeurs, Paris
Vol. No 1
1959
9. Merck Reactivos.
INFORMACION SOBRE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
E. Merck Darmstadt (R. R. de Alemania)
1981
10. Klyne, W., etal.
STEROIDS REFERENCE COLLECTION
London, Great Britain
7 (1) 41, 65.
1966
11. Klyne, W., etal.
STEROIDS REFERENCE COLLECTION
London, Great Britain
6 (6) 605, 525.
12. Noguez, A. A.
ESPECTROSCOPIA VISIBLE Y ULTRAVIOLETA (Seminario)
Asociacion Farmacéutica Mexicana.
1981

13. CURSO TEORICO-PRACTICO DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA I
APLICADO A LA INDUSTRIA (Química, Farmacéutica, Cosmé
tica y alimentaria)

Merck México, S. A.

1981

14. Romén G. F.

VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS. (Seminario)

Asociación Farmacéutica Mexicana.

1981