

30
2 y.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
PARA AMMOIDIN EN SUS FORMAS
FARMACEUTICAS DE TABLETAS
Y TINTURA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N :

MARIA DEL PILAR LEYVA JUAREZ
MINERVA ARACELI LOZANO HIPOLITO



México, D. F.

1989

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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

	Páginas
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	3
2.1. Farmacología	3
2.1.1. Agentes Repigmentantes	5
2.2. Monografía del Ammoidin	5
2.3. Espectrofotometría	7
3. VALIDACION DEL METODO ANALITICO	10
3.1. Antecedentes	10
3.2. Definición	11
3.3. Parámetros a evaluar	11
3.3.1. Linealidad	11
3.3.2. Exactitud	12
3.3.3. Precisión	12
3.3.3.1. Repetibilidad	12
3.3.3.2. Reproducibilidad	13
3.3.4. Especificidad	13
3.3.5. Sensibilidad	13
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
5. OBJETIVOS	15
6. HIPOTESIS	16
7. MATERIAL Y EQUIPO	17
7.1. Material	17
7.2. Equipo	17
7.3. Reactivos	17
8. DESARROLLO EXPERIMENTAL	18
8.1. Pruebas preliminares	18
8.2. Desarrollo del método analítico	19
8.2.1. Determinación de la longitud de máxima absorción	19
8.2.2. Metodología Analítica	19
8.2.3. Linealidad del sistema	21
8.2.4. Linealidad del método	21
8.2.5. Exactitud	21

	Páginas
8.2.6. Precisión	21
8.2.7. Sensibilidad	22
9. RESULTADOS	23
9.1. Linealidad del sistema	23
9.2. Linealidad del método analítico	24
9.3. Validación del método analítico	28
9.3.1. Forma farmacéutica Tintura	28
9.3.2. Forma farmacéutica Tabletas	33
9.3.3. Sensibilidad	38
10. DISCUSION DE RESULTADOS	39
11. CONCLUSIONES	42
12. SUGERENCIAS	43
13. APENDICE	44
14. BIBLIOGRAFIA	49

1. INTRODUCCION

En la actualidad es importante evaluar continuamente la -- calidad y confiabilidad de los procedimientos analíticos cuantitativos que se utilizan en la Industria Farmacéutica. Por consiguiente, la introducción de sistemas de control de calidad en forma rutinaria es esencial para asegurar que el sistema o método aplicado es el más adecuado, y que sus resultados reflejan lo más aproximado a la concentración del, o los compuestos a -- ser cuantificados (1).

El uso médico de las xantotoxinas es muy importante y particularmente los psoralenos (furocumarinas), que aumentan la capacidad de la piel para el bronceamiento en el control de leucoderma, que presenta características esenciales de una zona de piel blanca con hiperpigmentación en la periferia. Algunos derivados de los psoralenos son obtenidos natural y sintéticamente, y son estudiados por su naturaleza o actividad fotosensibilizante (2)(3).

La validación es sin duda, el centro de los mayores cambios en las normas de las Buenas Prácticas de Manufactura, e implica poner a prueba un proceso o método con el objeto de determinar los parámetros óptimos de operación y su metodología de control, para así reproducir eficazmente lote tras lote, un producto farmacéutico acorde a las especificaciones de calidad establecidas (4)(5).

Los métodos analíticos aplicados en la actualidad, nos han permitido desarrollar y aplicar técnicas estadísticas confiables para determinar fármacos contenidos en diversas formas farmacéuticas, así como para conocer la estabilidad de las mismas.

En la actualidad contamos además del método espectrofotométrico para la cuantificación de Ammoidin, con algunos otros como son: el método gravimétrico, fluorométrico, cromatográfico, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos.

En el presente trabajo, se determinó el método espectrofotométrico, como el más adecuado para la cuantificación de Ammoidin a una longitud de onda de 300 nm, tomándose en cuenta que se desea una técnica que además de ser sencilla, sea de bajo costo, que los excipientes de la formulación no interfieran en la cuantificación del principio activo, que el método tenga una sensibilidad adecuada, que la exactitud y precisión alcanzadas sean proporcionales a la información deseada, que sea confiable y finalmente que el tiempo requerido para que se lleve a cabo el análisis sea adecuado, de acuerdo a las necesidades del laboratorio.

2. GENERALIDADES

2.1. FARMACOLOGIA

El Ammoidin sensibiliza la piel vitiligosa a la luz ultravioleta. Se obtiene de la Ammi-najus, planta que usaban los antiguos egipcios para producir pigmentación en las áreas cutáneas afectadas por el vitiligo.

El término Vitiligo, que por mucho tiempo, ha sido usado incorrectamente para indicar los diferentes tipos de leucoderma, se restringió para indicar el leucomelanoderma de origen idiopático. Sus características esenciales son, una zona de piel blanca con hiperpigmentación en la periferia. En algunos casos la función pilomotora y las glándulas sebáceas son afectadas, y por consiguiente es común encontrar vello sobre las manchas blancas.

Las lecturas tienen topografía y tamaño variable, se encuentran principalmente en la cara, cuello, antebrazos, dorso de las manos y en los órganos genitales externos; raramente se observan en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, la distribución de las manchas es segmentada a menudo bilateral y casi simetral.

El vitiligo es uno de los problemas dermatológicos más comunes y es una enfermedad de tiempo inmemorial.

Durante el tratamiento del Ammoidin, por vía bucal, el aumento de la sensibilidad se manifiesta en una hora, alcanza su máximo en dos horas y desaparece en aproximadamente en ocho horas. La aplicación tópica es más eficaz y el aumento de la sensibilidad cutánea persiste varios días.

El Ammoidin fué aplicado como solución a las manchas vici-
ligosas, seguidas por irradiación solar y se observó que única-
mente las manchas tratadas tenían repigmentación sin embargo, -
un alto porcentaje de las curaciones se alcanzó mediante la com-
binación del tratamiento oral y tópico, seguida por irradiación
solar. Se concluyó que el tratamiento oral-tópico es el más ---
efectivo que cada uno de ellos por separado.

Pathak y Fitzpatrick han demostrado que la aplicación tópi-
ca o administración oral de Ammoidin puede hacer que aparezcan
las respuestas de éritema y pigmentación, en el hombre y en los
animales, con fuente de radiación ultravioleta (longitud de on-
da 320 nm - 390 nm), o luz solar.

Los Psoralenos aumentan la capacidad de la piel para el --
bronceamiento; el bronceamiento aumentado de la piel después de
la ingestión de psoralenos ha sido estudiado por muchos autores,
ejemplo de ello es Gray (6).

Los pacientes con vitiligo bajo la terapia con psoralenos
siempre muestran un bronceamiento incrementado de las áreas nor-
males de la piel expuestas a la luz solar o radiaciones ultra--
violeta.

Hay evidencias de que el Ammoidin administrado oralmente,
posee una propiedad de protección de la piel contra la radiación
ultravioleta, aumentando el promedio de tolerancia de las perso-
nas normales a la luz solar.

2.1.1. Agentes Repigmentantes.

El vitiligo es un transtorno de la piel, en donde cesa la función de los melanocitos en zonas circunscritas de la piel; - el resultado es una despigmentación de la epidermis (leucoderma), y una pérdida de color del pelo. Los problemas que se presentan son la sensibilidad de las placas despigmentadas a la luz solar y su aspecto antiestético en personas de piel oscura (2)(9).

Los psoralenos, son productos que naturalmente existen en muchas plantas y sus propiedades de aumentar la pigmentación se conoce desde la antigüedad.

El Ammoidin (Metoxalen), es un derivado metoxipsoralénico que se obtiene del Ammi-majus, planta que usaban los antiguos egipcios para producir la pigmentación en las áreas cutáneas -- afectadas por el vitiligo, estimando así la respuesta de melanocitos a la radiación ultravioleta, actualmente existen tres formas farmacéuticas (tabletas, tintura y ungüento), las cuales -- constituyen dos vías de administración que son oral y tópica.

2.2. MONOGRAFIA DEL AMMOIDIN

2.2.1. Nombre Químico:

9-metoxi-7H-furo[3,3-g][1] benzopirano-7-ona; β -lactona de ácido 6-hidroxi-7-metoxi-5-benzofuranoacrílico; 8 metoxi-4',5':6,7-furano cumarina.

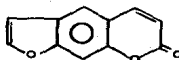
2.2.2. Nombre Genérico:

Ammoidin, Metoxalen, Meladinina, Xantotóxina, 8-Metoxipsoralen.

2.2.3. Fórmula Empírica:



2.2.4. Fórmula Estructural:



2.2.5. Peso Molecular:

216.18 g/ml

2.2.6. Descripción:

Se presenta en forma de pequeños cristales en forma de aguja alargados de color blanco, de sabor amargo, seguido por una sensación picante, inodoro.

2.2.7. Solubilidad:

Es prácticamente insoluble en -- agua fría, parcialmente soluble en agua a ebullición, libremente soluble en cloroformo, soluble - en alcohol, ácido acético y en - álcalis acuosos.

2.2.8. Método de Identificación:

- a) El espectro de absorción ultravioleta exhibe máximos a la - misma longitud de onda que -- una solución similar de Amolin U.S.P. (std), conjuntamente medidas a una longitud de onda de 300 nm.
- b) Disolver por calentamiento, - aproximadamente 10 mg en 5 ml de ácido nítrico diluido; la solución se torna amarilla.

- c) Alcalinizar la solución anterior con hidróxido de sodio - al 40%: La solución se torna café.

- d) Suspender aproximadamente 10 mg de Ammoidin en 5 ml de ácido sulfúrico concentrado: Se desarrolla un color amarillo, el cual cambia gradualmente a café obscuro. (10)(11)(12).

2.3. ESPECTROFOTOMETRIA

Actualmente la espectrofotometría ultravioleta-visible se ha convertido en uno de los instrumentos más ampliamente usados en los laboratorios analíticos, debido a la sencillez del manejo, interpretación, confiabilidad y bajo costo económico.

La espectrofotometría de absorción consiste en la medida de la absorción, de la radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática.

La ley fundamental que rige la fotometría de absorción es la Ley de Beer, cuando un haz de luz monocromática que se transmite en planos paralelos, penetra a un medio absorbente a ángulos rectos con superficies planas y paralelas del medio, la disminución de su poder de radiación con respecto al trayecto luminoso (espesor de la celda) b , o con la concentración del material absorbente, c gramos por litro, sigue una progresión exponencial.

La banda espectral empleada en las mediaciones descriptas a continuación, se extiende desde las cortas longitudes de onda - de la zona ultravioleta hasta la zona visible del espectro, este intervalo espectral, puede considerarse como si estuviera -- constituido por dos zonas, la ultravioleta (190 - 380 nm), y la visible (380 - 780 nm).

Cuando cierta cantidad de luz se hace llegar a una substancia, una parte de la luz se absorbe de acuerdo a su estructura molecular. Toda sustancia tiene su propio nivel el cual es específico para las moléculas constituyentes. Cuando la luz tiene una energía igual a la diferencia entre la energía del estado - basal (E_0), y la del estado excitado la sustancia la absorbe, los electrones que se encuentran en el estado basal son transferidos al estado excitado, y entonces esa energía corresponde a una longitud de onda. Los electrones excitados pierden energía por el proceso de radiación calorífica y regresan a su estado - basal.

Una longitud de onda de la luz se define, como la diferencia entre las dos crestas, o valles de una onda en dirección de propagación de la onda y se expresa por el símbolo λ .

Básicamente todos los tipos de espectrofotómetros están disñados de modo que permitan el paso de una radiación esencialmente monocromática a través de la sustancia problema.

Los componentes básicos de un espectrofotómetro son:

- 1) Una fuente de energía radiante y generalmente emplea una lámpara de descarga de Hidrógeno o Deuterio para la región ul-travioleta, y una lámpara de Tungsteno para la región visible.
- 2) Un monocromador para desdoblar la radiación en las longitudes de onda, y se clasifican de acuerdo al tipo de dispersor usado, ya sea una rejilla de difracción.

- 3) Celdas que son los recipientes transparentes para la muestra, las más comúnmente usadas son las cuadradas de 10 mm, las -- cuales son generalmente de material de cuarzo.
- 4) Un detector que transforma la radiación en señal eléctrica. Existen muchos tipos de fotodetectores tales como fotoceldas de silicón, fototubos y fotomultiplicadores.
- 5) Dispositivos acoplados de amplificación, medición y registro.

Se encuentran instrumentos de un sólo haz y de doble haz -- ambos son igualmente útiles. Según el tipo de aparato que se em pleé, los resultados pueden hacerse visibles en una sola escala o un registrador digital, y quedar registrados o impresos. O -- bien pueden representarse gráficamente de acuerdo a la distribu ción de intensidad de la radiación electromagnética, emitida o absorbida por la muestra, en función de la longitud de onda (o frecuencia de dicha radiación).

3. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

3.1. ANTECEDENTES

Obtener medicamentos cada vez mejores a llevado a la Industria Farmacéutica a la adopción y práctica de métodos de manufactura reconocidos como correctos y efectivos. Para considerarse como tal es necesario que estén debidamente validados.

La base del concepto de validación de métodos analíticos tienen sus orígenes a partir de tres comunicados emitidos por la Food and Drug Administration (FDA). En donde el primero de ellos a partir de 1906, se exige el control de medicamentos (evitando la adulteración de los mismos). El segundo en 1938, -- convocado a los fabricantes a eliminar de las formulaciones, -- aquellas substancias que pudieran causar algún efecto tóxico; -- de esta manera se implementa el acta correspondiente al condicionamiento de la seguridad del medicamento. El último de ellos en 1962, pide comprobar plenamente la eficacia de un producto farmacéutico, como consecuencia de los efectos secundarios de la talidomida y las intoxicaciones provocadas por una contaminación cruzada durante la fase de fabricación y acondicionamiento de la penicilina determinan que, a partir de 1963 se permite -- conceptualizar la no idoneidad de un medicamento si las condiciones de elaboración no son las mínimas aceptables.

A partir de 1967, surge el establecimiento de unas normas de correcta fabricación y de control de calidad, emitidas por las Buenas Prácticas de Manufactura (B.P.M.), (13)(14)(15). Durante el estudio de esta reglamentación queda clara la necesidad de establecer en forma correcta los procedimientos de manufactura y control de medicamentos. Esto es, considerar todos -- aquellos factores que contribuyen a la elaboración de la calidad de los procesos de fabricación, así como la reproducibilidad del producto lote a lote. La demostración de que estos pro-

cedimientos son correctos y verdaderos se conoce actualmente -- con el nombre de VALIDACION.

Sin embargo, fué hasta 1983, después de una serie de acuerdos entre el F.D.A. y asesores de la Industria Farmacéutica, -- que se establecen una serie de reglas aplicando las B.P.M. De esta manera se determina el significado del proceso de validación, criterios y limitantes para considerar la validez de un proceso y por ende del método analítico (14)(15).

3.2. DEFINICION

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales de laboratorio, que la capacidad del método cumpla los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Actualmente el concepto de validación es considerado como el procedimiento documentado por el cual se establece la exactitud, variabilidad e interferencia de posibles errores y especificidad del método analítico (15)(16).

3.3. PARAMETROS A EVALUAR

3.3.1. Linealidad.

Mide el grado en que la respuesta del método, al trabajar a diferentes concentraciones, se aproxima a una función lineal del tipo $y = a + bx$, donde "y" es la variable dependiente o respuesta medida, "x" es la variable independiente o concentración, "a" es la ordenada al origen e indica el valor de la respuesta medida que corresponde a cero de concentración, y "b" es la pendiente un valor que representa las variaciones de "y" por cada variación de "x".

En la práctica se practican los datos experimentales, de tal manera que la capacidad recobrada esté en función de la cantidad adicionada al placebo para observar el grado en que los resultados se comportan como una función lineal, se aplica el análisis de regresión lineal.

Y para estimar el porcentaje de la variación de "x" se aplica el análisis de correlación.

3.3.2. Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y un valor de referencia.

Se expresa como el porciento de recobro, obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la substancia de interés.

3.3.3. Precisión.

Es la medida de la concordancia entre los resultados analíticos individuales experimentales respecto a un valor central. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

3.3.3.1. Repetibilidad. Se refiere a la concordancia entre resultados sucesivos obtenidos con el mismo método y bajo las mismas condiciones de trabajo (analista, aparato, tiempo, laboratorio, etc.)

3.3.3.2. Reproducibilidad. Se expresa como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en días diferentes, en el mismo o en diferente laboratorio y/ diferente equipo.

3.3.4. Especificidad.

Se refiere al grado en que los resultados del método analítico se deben sólo a la sustancia de interés, y no a otras --- sustancias que estén presentes en la formulación, es decir, indica si los excipientes de la formulación y/o productos de degradación formados interfieren con la señal medida.

3.3.5. Sensibilidad.

Es la menor concentración o menor cantidad del compuesto, que se puede detectar con el método analítico, pero no necesariamente cuantificada. La sensibilidad raramente es constante - sobre un rango grande de concentraciones, y por lo tanto, sólo es significativa, si se especifica el rango de concentración.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Establecer un método de análisis esta en función de las necesidades de cada una de las etapas involucradas en la fabricación de medicamentos. Es por eso que el laboratorio de control de calidad requiere contar con métodos analíticos capaces de -- brindar resultados exactos, precisos y con la mayor confiabilidad posible, a fin de dar el mayor nivel aceptable de calidad - para las formas farmacéuticas fabricadas.

El presente trabajo pretende verificar que tan confiable - es el método espectrofotométrico como método rutinario de control, para la cuantificación de ammidin a una longitud de onda de 300 nm, en sus formas farmacéuticas de tabletas y tintura, - mediante una evaluación estadística que nos permita conocer la exactitud y precisión de los datos y por lo tanto determinar la variabilidad de los mismos.

Este procedimiento es desarrollado de acuerdo a las nece si da de s del laboratorio de control de calidad, así como a las no r ma s re que ri da da s por la Industria Farmacéutica para el control de medicamentos.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la validación del método analítico espectrofotométrico, para la cuantificación de Ammoidin como principio activo en las formas farmacéuticas de tabletas y tintura.

5.2 OBJETIVO ESPECIFICO

- 5.2.1. Determinar la linealidad del sistema, linealidad del método analítico, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad como parámetros de validación.
- 5.2.2. Verificar que el método empleado sea sencillo, rápido, confiable y de bajo costo.

6. HIPOTESIS

Manteniendo el proceso, y las condiciones adecuadas de trabajo, verificando cada operación que pueda afectar las variables del método de análisis, en la cuantificación del principio activo (Ammoidin), en las formas farmacéuticas de tabletas y tintura, se busca que el método propuesto sea; lineal, exacto, preciso, específico, reproducible y específico frente a productos de degradación y excipientes.

7. MATERIAL Y EQUIPO

<u>7.1. MATERIALES</u>	<u>MARCA</u>	<u>DESCRIPCION</u>
Matraces volumétricos		10, 50 y 100 ml
Pipetas volumétricas		1,2,3,4,5, y 10 ml
Vasos de precipitados		10, 50 y 100 ml
Microjeringa	Hamilton	50 mcl

(Todo el material de vidrio marca PYREX)

<u>7.2. EQUIPO</u>	<u>MARCA</u>	<u>MODELO</u>
Espectrofotómetro	Beckman	Mod. No. 25
Balanza Analítica	Sartorius	Tipo 180i
Balanza Granataria	Ohaus	1550 SD
Lámpara de luz UV	Universal Camag	TI-900/V
Malla		No. 12

<u>7.3. REACTIVOS</u>	<u>DESCRIPCION</u>
Amuoidin	No. de análisis 14370
Etanol (G.R.)	J.T. Baker
Formamida	J.T. Baker
Butiléter	J.T. Baker
Acetona (G.R.)	J.T. Baker
Benceno (G.R.)	J.T. Baker
Acetato de Etilo (G.R.)	J.T. Baker
Cloroformo (G.R.)	J.T. Baker
Hexano (G.R.)	J.T. Baker

8. DESARROLLO EXPERIMENTAL

8.1. PRUEBAS PRELIMINARES

Los productos de degradación que pudieron interferir en la cuantificación del activo Ammoidin, se analizaron por cromatografía en capa fina, de manera ascendente y descendente, sometiendo al activo a condiciones drásticas de temperatura, acidez y alcalinidad, como se muestra a continuación en la tabla I.

	CONDICIONES	CROMATOGRAFIA ASC. Y DESC.		TIEMPO (DIAS)	RESULTADO
TEMPERATURA °C	40	"	"	15	NEGATIVO
	60	"	"	15	NEGATIVO
	80	"	"	15	NEGATIVO
	100	"	"	15	NEGATIVO
ACIDEZ %	10	"	"	15	NEGATIVO
	30	"	"	15	NEGATIVO
	90	"	"	15	NEGATIVO
ALCALINIDAD %	10	"	"	15	NEGATIVO
	30	"	"	15	NEGATIVO
	90	"	"	15	NEGATIVO

TABLA I. Muestra los resultados a las diferentes condiciones a las que fue sometido el Ammoidin, determinándose la no presencia de productos de degradación.

8.2. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO

8.2.1. Determinación de la longitud de máxima absorción.

Para determinar la longitud de onda de máxima absorción en la región del ultravioleta cercano (200 - 380 nm), del espectro electromagnético; se pesó exactamente 30 mg de Ammoidin y se -- llevó a un matraz volumétrico de 50 ml llevándose al aforo con etanol. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml y se llevó a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforo con etanol. La con centración final obtenida fue de 6 mcg/ml.

Se llevó a cabo un barrido de 320 a 280 nm encontrándose -- que la longitud de máxima absorción era de 300 nm para el Ammoi din.

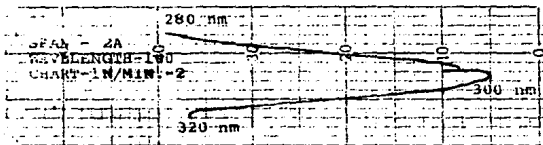


FIGURA 1. Representa la longitud de máxima absorción para el -- Ammoidin (Metoxalen).

8.2.2. Metodología Analítica.

8.2.2.1. Preparación del estándar.

Pesar exactamente 30 mg de Ammoidin y llevarlos cuantitati vamente a un matraz volumétrico de 100 ml aforar con etanol, -- tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétri co de 100 ml y aforar con etanol. La concentración final obteni da es de 6 mcg/ml.

8.2.2.2. Preparación de la muestra.

8.2.2.2.1. Tintura

Tomar con una pipeta volumétrica 4 ml de la muestra y llevarla cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml aforar con etanol. La concentración final obtenida es de 6 mcg/ml.

8.2.2.2.2. Tabletas

Tomar de las tabletas pulverizadas el equivalente a 30 mg de Ammoidin y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml aforar con etanol, agitar mecánicamente durante 15 minutos. Filtrar y desechar los primeros 20 ml. Posteriormente tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con etanol. La concentración final obtenida es de 6 mcg/ml.

8.2.2.3. Interferencia de Excipientes.

Para llevar a cabo esta prueba, se realizaron experimentalmente pruebas para cada uno de los excipientes y placebos de cada una de las formas farmacéuticas, se manejaron a la misma concentración que las muestras, se tomaron las lecturas de las --- absorbancias a la misma longitud de onda de máxima absorbancia que el principio activo. Se llevó a cabo un barrido desde una longitud de onda de 320 nm a 280 nm, encontrándose que los excipientes tanto de forma farmacéutica tintura como para tabletas, no interferían en la cuantificación de Ammoidin; por lo que se procedió a validar el método analítico.

8.2.3. Linealidad del sistema.

Se probaron una serie de concentraciones de Ammoidin siendo el rango de 2 - 12 mcg/ml y se realizaron tres repeticiones para cada concentración, para así de esta manera obtener la más adecuada según la Ley de Beer, se trabajó el mismo día a las -- mismas condiciones de operación, equipo y laboratorio. Los datos obtenidos se ajustaron por el método de mínimos cuadrados, y de esta manera se determinó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación.

8.2.4. Linealidad del método analítico.

Se elaboraron tres curvas en el mismo día, trabajando en -- condiciones idénticas de operador, equipo y laboratorio y se -- llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en el punto 8.2.3.

8.2.5. Exactitud.

Para la determinación de este parámetro se realizaron los análisis de recobro del Ammoidin, es decir de las formulaciones con placebo adicionadas con cantidades conocidas del principio activo, teniendo concentraciones del 85%, 100% y 115% de la cantidad especificada en el marbete. Los resultados obtenidos son analizados por el estadígrafo de "t" student.

8.2.6. Precisión.

Se refiere a una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales respecto a un valor central evaluando se mediante la repetibilidad y reproducibilidad.

8.2.6.1. Repetibilidad.

Para este caso se realizó la estimación de la desviación - estándar de los datos experimentales. Mediante una prueba de ji cuadrada, se evalúa la significancia de la variabilidad. Probando tres niveles de concentración del principio activo de 85%, - 100% y 115%, llevando a cabo ocho repeticiones para cada nivel, utilizando placebos cargados.

8.2.6.2. Reproducibilidad.

Para su evaluación se realizó el estudio de la forma farmacéutica de tabletas y tintura de Ammoidin al 100% de concentración realizando tres repeticiones por cada analista y día trabajado a las mismas condiciones de equipo, reactivos, en días diferentes.

8.2.7. Sensibilidad.

Para la evaluación se realizó una serie de diluciones partiendo de una concentración de 6 mcg/ml y se disminuyó la concentración hasta encontrar la cantidad mínima detectable, por el aparato empleado para el análisis.

9. RESULTADOS

9.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

TABLA II. Resultados obtenidos en la linealidad del sistema. Pa
ra la cuantificación de Ammoidin.

CONCENTRACION EN mcg/ml.	2	4	6	8	10	12
Absorbancias	0.115	0.231	0.346	0.455	0.566	0.674
	0.117	0.230	0.347	0.456	0.566	0.674
	0.115	0.231	0.345	0.455	0.567	0.674
$\bar{X} =$	0.115	0.231	0.346	0.455	0.566	0.674

De la tabla II se obtuvieron los siguientes resultados, --
bajo un tratamiento estadístico utilizándose las fórmulas des--
critas en el Apéndice.

Ordenada al origen (b) = 0.007195
 Pendiente (m) = 0.05579
 Coeficiente de Correlación (r) = 0.9999

9.2. LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO

TABLA III. Resultados obtenidos en la linealidad del método --- analítico.

CONCENTRACION EN mcg/ml.	2	4	6	8	10	12
Absorbancias	0.119	0.233	0.346	0.453	0.568	0.677
	0.120	0.233	0.347	0.452	0.567	0.678
	0.119	0.232	0.347	0.452	0.567	0.677
\bar{X} =	0.119	0.233	0.347	0.452	0.567	0.677

De la tabla III se obtuvieron los siguientes resultados, - bajo un tratamiento estadístico utilizándose las fórmulas des-- critas en el Apéndice.

Ordenada al origen (b) = 0.009466
 Pendiente (m) = 0.055671
 Coeficiente de correlación (r) = 0.9999

TABLA IV. Resultados de la linealidad del método analítico para la cuantificación de Ammoidin.

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS
2	2.00
4	4.04
6	6.08
8	7.98
10	10.02
12	11.99

De la tabla IV se obtuvieron los siguientes resultados de su tratamiento estadístico, utilizando las fórmulas descritas en el Apéndice.

Ordenada al origen	(b) = 0.0366
Pendiente	(m) = 0.9978
Coefficiente de Correlación	(r) = 0.9999

FIGURA 2. Representación gráfica de la linealidad del método - analítico en la cuantificación de Ammoidin.

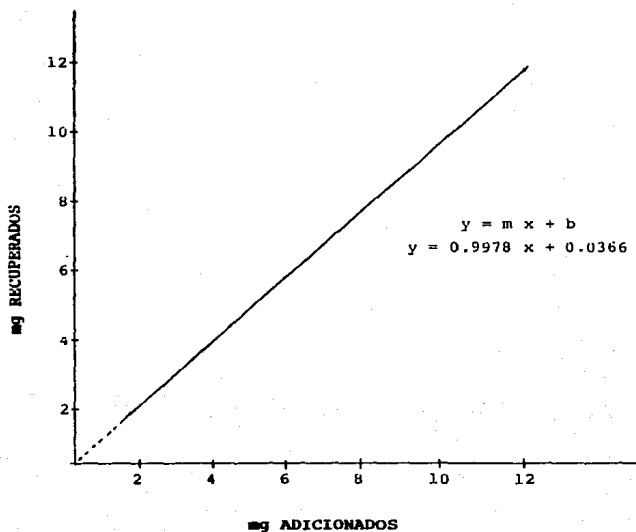


TABLA V. Resultados de la Regresión Lineal en la Validación -- del método analítico.

PUNTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{CAL}	F _{TABS}
Regresión	1	208.9974	208.9974	1741.645	8.53
Error de Regresión	16	1.9202	0.9202	0.1200	
Falta de Ajuste	4	0.7475	0.1868	1.9119	3.26
Error Puro	12	1.1727	0.0977		

NOTA: Las fórmulas empleadas para el tratamiento estadístico se encuentran en el Apéndice.

9.3. RESULTADOS DE VALIDACION

9.3.1. Evaluación estadística para la forma farmacéutica de tintura, para la determinación de exactitud y precisión.

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECUBRO
8.40	8.44	100.47
8.40	8.40	100.00
8.40	8.38	99.76
8.40	8.42	100.23
8.40	8.36	99.52
8.40	8.38	99.76
8.40	8.36	99.52
8.40	8.40	100.00

7.49	7.50	100.13
7.49	7.50	100.13
7.49	7.52	100.40
7.49	7.50	100.13
7.49	7.50	100.13
7.49	7.52	100.40
7.49	7.50	100.13
7.49	7.48	99.86

6.37	6.36	99.84
6.37	6.33	99.37
6.37	6.36	99.84
6.37	6.38	100.15
6.37	6.36	99.84
6.37	6.38	99.37
6.37	6.36	99.84

% DE RECOBRO

$$\bar{X} = 99.950$$

$$DS = 0.307$$

$$s = 0.300$$

9.3.1.1. EXACTITUD

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

$$H_1 = \mu \neq 100\%$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

$$t_{cal} = -0.7973$$

$$t_{0.975} = 2.0687$$

$$-2.06 \leq -0.7973 \leq 2.0687$$

INTERVALO DE CONFIANZA

$$99.95 \leq 100 \leq 100.079$$

9.3.1.2. PRECISION

$$H_0 = \sigma \leq 2\%$$

$$H_1 = \sigma > 2\%$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

$$X_{1\text{ cal}}^2 = 0.5427$$

$$X_{1\text{ 0.975}}^2 = 38.076$$

Siendo:

$$0.5427 < 38.076$$

INTERVALO DE CONFIANZA

$$0.2387 < \sigma < 0.4309$$

COEFICIENTE DE VARIACION

$$0.3073\%$$

9.3.1.3. Reproducibilidad.

TABLA VI. Resultados obtenidos en el estudio del efecto-analista-día para la reproducibilidad del método analítico espectrofotométrico para la determinación del principio activo Ammoidin, en su forma farmacéutica de tintura.

	DIA I % DE RECOBRO	DIA II % DE RECOBRO
ANALISTA I	99.61	99.09
	99.19	99.33
	99.61	99.33
ANALISTA II	99.49	98.79
	99.32	99.04
	99.49	99.04

TABLA VII. Análisis de Varianza para reproducibilidad del método espectrofotométrico de Ammoidin $\alpha = 0.05$.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	M.C.	F _{cal}	F _{tab}
ANALISTA	1	0.07	0.07	0.77	5.32
DIA	2	0.43	0.21	2.33	4.46
ERROR	8	0.23	0.09		
TOTAL	11	0.73	0.36		

NOTA: Las fórmulas empleadas para los cálculos se encuentran reportadas en el Apéndice.

9.3.2. Evaluación estadística para la forma farmacéutica de tabletas, para la determinación de exactitud y precisión.

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
35.26	35.38	100.34
35.26	35.20	99.84
35.26	35.29	100.09
35.26	35.29	100.09
35.26	35.38	100.34
35.26	35.47	100.59
35.26	35.29	100.09
35.26	35.38	100.34
<hr/>		
30.00	29.70	99.01
30.00	29.79	99.30
30.00	29.70	99.01
30.00	29.70	99.01
30.00	29.96	99.89
30.00	29.14	100.48
30.00	30.05	100.19
30.00	29.88	99.60
<hr/>		
26.06	26.00	99.79
26.06	26.11	100.21
26.06	25.89	99.38
26.06	26.00	99.79
26.06	26.11	100.21
26.06	25.09	99.34
26.06	26.00	99.79
26.06	26.11	100.21

% DE RECOBRO

$$\bar{X} = 99.9734$$

$$DS = 0.4114$$

$$\sigma = 0.4028$$

9.3.2.1. EXACTITUD

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

$$H_0 = \mu \neq 100\%$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

$$t_{cal} = -0.3167$$

$$t_{0.975} = 2.0687$$

$$-2.0637 < -0.3167 < 2.0687$$

INTERVALO DE CONFIANZA

$$99.937 < 100 < 100.0088$$

9.3.2.2. PRECISION

$$H_o = \sigma \leq 2\%$$

$$H_i = \sigma > 2\%$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

Repetibilidad

$$\chi_{\text{cal}}^2 = 0.9737$$

$$\chi_{i, 0.975}^2 = 38.076$$

Siendo:

$$0.9734 < 38.076$$

INTERVALO DE CONFIANZA

$$0.3197 < \sigma < 0.57719$$

COEFICIENTE DE VARIACION

$$0.4115\%$$

9.3.2.3. Reproducibilidad.

TABLA VIII. Resultados obtenidos en el estudio del efecto analista-día del método analítico espectrofotométrico para la -- determinación del principio activo Ammoidin, en su forma farmacéutica de tabletas.

	DIA I % DE RECOBRO	DIA II % DE RECOBRO
ANALISTA I	99.86	100.17
	100.17	99.00
	99.59	99.30
ANALISTA II	99.59	99.89
	99.30	100.47
	99.01	99.59

TABLA IX. Análisis de Varianza para reproducibilidad del método --
espectrofotométrico de Ammoidin $\alpha = 0.05$.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	M.C.	F _{cal}	F _{tab}
ANALISTA	1	0.01	0.01	0.05	5.32
DIA	2	0.86	0.43	2.38	4.46
ERROR	8	1.47	0.18		
TOTAL	11	2.40	0.21		

NOTA: Las fórmulas empleadas para los cálculos, se encuentran reportadas en el Apéndice.

9.3.3. Sensibilidad.

TABLA X. Muestra los resultados de las diferentes concentraciones de Ammoidin, probadas para determinar la concentración mínima detectable por el espectrofotómetro, se -- realizaron cinco repeticiones para cada concentración.

CONCENTRACION mcg/ml	ABSORBANCIAS					X
	1	2	3	4	5	
6.13	0.302	0.305	0.305	0.304	0.306	0.304
3.06	0.182	0.185	0.184	0.182	0.182	0.182
1.20	0.100	0.102	0.101	0.100	0.101	0.100
0.90	0.049	0.049	0.050	0.051	0.049	0.049
0.60	0.038	0.035	0.036	0.038	0.039	0.037
0.18	0.024	0.020	0.019	0.022	0.024	0.021

De la tabla anterior se obtuvieron los siguientes resultados:

Ordenada al origen	(b) = 0.01944
Pendiente	(m) = 0.04806
Coefficiente de correlación	(r) = 0.9893

10. DISCUSION DE RESULTADOS

Una vez definido el producto, se procedió a seleccionar el método para la cuantificación del activo Ammoidin, utilizando - el método espectrofotométrico, por ser el más sencillo, rápido, económico y confiable; por lo tanto reproducible y fácil de controlar a las condiciones de trabajo establecidas por el laboratorio de control de calidad; cumpliendo los parámetros establecidos por Farmacopea.

Se evaluó la presencia de productos de degradación de Ammoidin por cromatografía en capa fina, probando diferentes sistemas de elución reportados en la bibliografía (10), y probando diferentes concentraciones; el principio activo Ammoidin se sometió a condiciones drásticas de degradación, en un medio alcalino utilizando concentraciones de Hidróxido de Sodio desde 10 - 90%, en un medio ácido se utilizó Acido Sulfúrico desde una concentración desde 10 - 90%, se evaluó también la temperatura a 40°, 60°, 80° y 100°C durante un tiempo de 15 días. Al término de éste tiempo se determinó por cromatografía en capa fina, la aparición de posibles productos de degradación; los sistemas de revelado fueron: Permanganato de Potasio-Acido Sulfúrico (3:5), en 100 ml de agua, luz ultravioleta y cámara de yodo. -- Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de productos de degradación.

Con base a lo anterior se procedió a validar el método analítico espectrofotométrico, elaborando una curva estándar, probando -- concentraciones de 2 - 15 mcg/ml. Los resultados obtenidos en este punto indican que el rango adecuado de concentraciones a probar, se encuentra de 2 - 12 mcg/ml.

Como muestran los resultados obtenidos en la tabla II, el coeficiente de correlación de 0.9999, con respecto a la pendiente se demostró con base a una prueba de "t" student que estadísticamente es igual a 1, realizándose un análisis con el mismo estadígrafo "t" para comprobar que la ordenada al origen tiene un valor estadístico igual a cero.

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis de varianza, -- que demostró ser significativo para el efecto de regresión, así como no presentar valores significativos para el efecto de falta de ajuste. En base a lo anterior podemos concluir que el método analítico validado es lineal en el intervalo de concentraciones de 2- 12 mcg/ml.

Para la prueba de repetibilidad se fabricó un lote piloto de placebo cargado para tintura y tabletas, trabajando tres concentraciones, de acuerdo a la cantidad estipulada en el marbete, siendo éstas de 85%, 100% y 115% realizándose ocho repeticiones por cada nivel, se contrastó la hipótesis nula de una varianza menor o igual al 2% a través de la prueba de Ji cuadrada, estableciendo como resultado que no existía suficiente evidencia para rechazar dicha hipótesis nula.

En cuanto a la reproducibilidad, se evaluó probando a través de un diseño completamente al azar para los factores analista (Ai) y día (Dji), cada uno de ellos a dos niveles. Cada uno de los tratamientos fué evaluado mediante el análisis de lotes independientes con tres repeticiones por tratamiento y trabajando a la concentración con la concentración estipulada en el marbete al 100%. El análisis de varianza correspondiente mostró no presentar efecto significativo para el analista.

En cuanto a la exactitud la hipótesis nula propuesta de -- que la media de los resultados experimentales obtenidos fuera -- igual a un 100% (valor teórico), se contrastó a través de un -- estadígrafo de "t" student. El análisis obtenido demostró no -- presentar un efecto significativo cuando se empleó un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, por lo que podemos concluir que el método analítico espectrofotométrico para Ammoidin es EXACTO.

Para la evaluación de la cantidad mínima del principio activo Ammoidin que es capaz de detectar el método espectrofotométrico, se obtuvo como resultado que dicho método fue capaz de detectar una concentración de 0.18 mcg/ml.

11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que los objetivos fueron alcanzados en su totalidad, ya que el método espectrofotométrico para la cuantificación de Ammoidin en -- sus formas farmacéuticas tintura y tabletas resultó ser: **LINEAL, PRECISO, EXACTO, SENSIBLE Y ESPECIFICO** frente a productos de -- degradación. Este último parámetro se realizó frente a produc-- tos de degradación y frente a excipientes, por lo cual podemos establecer que el método anteriormente mencionado, puede ser empleado como método rutinario en el laboratorio de control de calidad, o como un método indicativo de estabilidad.

Adicionalmente se puede decir que el tiempo empleado para la cuantificación de Ammoidin en sus formas farmacéuticas de -- tintura y tabletas es adecuado para el laboratorio donde se realizó la validación, además después de analizar el costo de análisis, se puede decir que éste es reducido.

12. SUGERENCIAS

Tomando en base las pruebas realizadas para provocar la --
degradación del principio activo, utilizar condiciones más drás
ticas de temperatura, acidez y alcalinidad para observar si ---
efectivamente el producto puede degradarse para continuar con -
las pruebas de estabilidad.

13. APENDICE

- \bar{X} = Media Aritmética
 DS = Desviación Estándar
 σ = Desviación Poblacional
 H_0 = Hipótesis nula
 H_1 = Hipótesis alterna
 C.V. = Coeficiente de Variación

A. LINEALIDAD

$$a = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} = \text{Ordenada al Origen}$$

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

Cálculo de error típico de estimación modificada:

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

Estadígrafo de Contraste:

$$a) \text{ Ordenada al origen } t_{\text{cal}} = \frac{a - a_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (x_i - \bar{X})^2}}}$$

b) Pendiente

$$t_{\text{cal}} = \frac{(b - b_0) S_x \sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$$

COEFICIENTE DE CORRELACION

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

B. EXACTITUD

Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X} - \mu_0}{S/\sqrt{n}}$$

Intervalo de confianza para al 95%

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

C. PRECISION

a. Repetibilidad

Estadígrafo de contraste:

$$X_{\text{cal}}^2 = \frac{(n-1) S^2}{\sigma^2}$$

Intervalo de confianza:

$$\sqrt{\frac{(n-1) S^2}{X^2}} \quad \sqrt{\frac{(n-1) S^2}{X^2}}$$

b. Reproducibilidad

Modelo Lineal Estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + E_k(ij)$$

Donde:

Y_{ijk} = Observación del i-ésimo analista del
j-ésimo día de la k-ésima repetición.

μ = Media general

A_i = Analista i-ésimo

D_j = Día j-ésimo

$E_k(ij)$ = Error experimental

Para la interpretación estadística se realizó un -
análisis de varianza para el modelo arriba mencio-
nado.

TABLA DE ANAADEVA

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F_{cal}	F_{tab}
A_i	$(a-1)$	$\frac{\sum Y_i^2}{br} - \frac{Y_{...}^2}{abr}$	$\frac{SC_{A_i}}{a-1}$	$\frac{MC_A}{MC_E}$	$\frac{GL_{A_i}}{GL_{E_k}}$
D_j	$(b-1)a$	$\frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{r} - \frac{\sum Y_{i.}^2}{abr}$	$\frac{SC_{D_j}}{(b-1)a}$	$\frac{MC_D}{MC_E}$	$\frac{GL_{A_i}}{GL_{E_k}}$
$E_k(ij)$	$(r-1)ab$	$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{...}^2}{abr}$	$\frac{SC_E}{(r-1)ab}$		
Total	$N-1$	$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2$			

AREA DE ACEPTACION

$$F_{cal} \leq F_{0.95}$$

D. FALTA DE AJUSTE

Modelo lineal Estadístico

$$Y_{ij} = B_0 + B_1 X_i + E_j(i)$$

$$i = 1 \dots \dots \dots t$$

$$j = 1 \dots \dots \dots n$$

Donde:

B₀ = Ordenada al origenB₁ = PendienteY_{ij} = Observación (mcg recobrados) del i-ésimo tratamiento, (mcg adicionados) de la j-ésima repetición.X_i = i-ésimo tratamiento (mcg adicionados)E_j(i) = Error experimental de la j-ésima repetición dentro del i-ésimo tratamiento.

Para la interpretación estadística se realizó un análisis de varianza para el modelo arriba mencionado.

TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{cal}	F _{tab}
REGRESION	1	SCr	SCr	SCr/MCcr	
ERROR DE REGRESION	n-2	SCcr	SCcr/GLcr		
FALTA DE AJUSTE	(n-2)-tx(r-1)	SCfa	SCfa/GLfa	$\frac{MCfa}{MCep}$	
ERROR PURO	tx(r-1)	SCep	SCep/Glep		

DONDE:

$$SCr = m \times Sxy + b \times Sy - ((Sy)^2/n) =$$

$$SCer = Sy^2 - m \times Sxy - bxSy =$$

$$SCep = Sy^2 - (SY_i^2)/r =$$

$$SCfa = SCer - SCep =$$

Se determinó los valores para F_{tab} en la forma siguiente:

$$F(GL.r, GL.er; 0.99)$$

$$F(GL.fa, GL.ep; 0.95)$$

AREA DE ACEPTACION

$$F_{cal} \rightarrow F_{tab} (GLr, GLer; 0.99)$$

$$F_{cal} < F_{tab} (GLfa, GLep; 0.95)$$

14. BIBLIOGRAFIA

1. Bedolla T.N., Ulloa A-A, Landeros J.V., Pérez P.P. Rev. Invest. Clin 36, 179-192 (1984).
2. Mustafa E.A., El-Tawil B.A., Phytochemistry, 3, 701 (1964).
3. Bowman W.C. & Rand M.J. "FARMACOLOGIA" Bases Bioquímica y Patología Aplicaciones Clínicas, 2a. Ed. Editorial Interamericana. México, D.F. (1985).
4. Guerra J. Finfelson M. "Validation of Analytical Methods Laboratories" by FDA, Pharmaceutical Technology 3, (7), 74-78 (1986).
5. Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed. Mack Publishing Co. Easton, Pennsylvania, 726 (1975).
6. Gray A.I. and Waterman P.G. Phytochemistry, 17, 845 (1978).
7. Schonberg A. Bradan N. and Starkowsky, N. J. Am. Chem. Soc., 77, 5438 (1955).
8. Drills J.A. Pharmacology in Medicine, 4a. Ed. Mac Graw-Hill. (1971).
9. Yearger E. and Augenstein L., J. Investiq. Dermatol, 44, 181, (1965).
10. Florey B.A. Analytical Profiles of Drugs, 9, 427-453 (1980).
11. The United States Pharmacopeia, 19th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. 317, (1975).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

12. The United States Pharmacopeia, 20th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., p. 667 (1985).
13. Loftus B.T. and Nash R.A. "Pharmaceutical Process Validation". Ed. Marcel Dekker Inc. N.Y. (1984), p. 251-255.
14. Vanderwielen J. Adrianus & Hardwidge A. Edward. "Guidelines for assay validation". Pharmaceutical technology. march., p. 21-24, (1982).
15. "Curso Teórico Práctico de Validación de Técnicas Analíticas", por AFM., México, Memorias de Congreso, (1981).
16. Taylor John K. "Validation of analytical methods"., -- Anal. Chem. 55, (6), 600-608, (1983).
17. Abbott D. & Andrews R.S. "Introducción a la Cromatografía", 3a. Edición, Editorial Alhambra. Capítulo 3, p. - 27-55, (1977).
18. Brokke M.E., and Christensen B.F., J. Org. Chem., 23, - p. 589 (1958).
19. Chatterjee D.K., Chatterjee R.M., and Den D., J. Org. Chem., 29, 2467 (1964).
20. Schonberg A., and Sina A., J. Am. Chem. Soc., 72, 4826 (1950).
21. Soine T.O., J. Pharm. Sci., 53, 231 (1964)

22. Lee K. & Soine T.O., J. Pharm. Sci., 58, 681 (1969).
23. Rodighiero G. & Antonello C., Chem. Abstr., 53, 200 - 46 (1959).
24. Antonello C., Chem. Abstr., 51, 6616 (1957).
25. Stewart A.B. & Shyluck, Anal. Chem., 34, 1058 (1962).
26. Berych and H. Poser., J. Chromat., 32, 87 (1968).
27. Esse R.C. & Christensen B.E., J. Org. Chem., 25, 1565 (1960).
28. Chakrabarti S.G., Gooray D.A. and Kenney J.A., Clin. Chem., 23, 1170 (1977).
29. Chakrabarti S.G., Gooray D.A., Ruff W.L. and Kenney - J.A., Clin. Chem., 24, 1155, (1958).