

40
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA CUANTIFICAR NORETINDRONA Y
MESTRANOL EN TABLETAS POR CROMATOGRAFIA
GAS-LIQUIDO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

P E D R O P E R E Z C O R T E S





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.

CONTENIDO

	pag.
I. INTRODUCCION.....	1
II. MARCO TEORICO.....	5
A. Desarrollo Historico.....	5
B. Cromatografia.....	7
C. Cromatografia de Gases.....	10
1. Fundamentos.....	10
a. Proceso cromatográfico.....	11
b. Tiempo de retención.....	12
c. Volumen de retención relativo.....	14
d. Posición del pico.....	14
e. Retención relativa.....	16
f. Ensanchamiento del pico.....	16
g. Resistencia a la transferencia de masa.....	20
h. Resolución.....	21
i. Componentes básicos de un sistema cromatográfico.....	23
j. Ventajas y limitaciones.....	35
D. Validación de un Método Analítico.....	38
E. Monografía.....	51
1. Propiedades farmacológicas	62
III. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	63
A. Antecedentes	63
B. Desarrollo del Método Analítico.....	64
C. Validación	73

IV. RESULTADOS.....	75
A. Validación Estadística.....	75
1. Linealidad.....	75
2. Exactitud.....	83
3. Precisión.....	87
4. Límite de cuantificación.....	93
5. Sensitividad.....	93
6. Linealidad del sistema.....	93
7. Especificidad.....	94
8. Tolerancia.....	94

V. ANALISIS DE RESULTADOS.....	97
---------------------------------------	-----------

VI. CONCLUSIONES.....	99
------------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

I. INTRODUCCION

Los preparados que contienen los principios activos de las glándulas endocrinas, pueden clasificarse, desde un punto de vista farmacológico, como fármacos. Aunque casi todos los fármacos se consideran sustancias extrañas al organismo, las hormonas son secreciones naturales de las glándulas endocrinas y ejercen importantes efectos funcionales sobre otros tejidos.¹

Resulta útil conservar la distinción entre hormonas y otras sustancias activas de diferente origen. Por definición, una hormona es una sustancia secretada por un tejido específico y transportada a distancia desde donde ejerce su efecto sobre otros tejidos específicos. Por otro lado los análogos de las hormonas, compuestos sintéticos parecidos a los productos naturales pero diferentes de ellos en algunos aspectos importantes, han resultado a menudo más útiles en la terapéutica que las hormonas mismas. Uno de los objetivos de la endocrinología es el aislamiento, la identificación y la síntesis de los principios activos de cada una de las glándulas endocrinas. Algunas hormonas pueden ser inactivas, cuando se administran por vía oral, como las catecolaminas, o también pueden degradarse con tanta rapidez que su efecto es escaso a menos que se inyecte con frecuencia, como las hormonas sexuales naturales. El preparado de análogos sintéticos, compuestos alterados suficientemente para "engañar" a las enzimas de degradación pero no para confundir a los sitios receptores, es una de las principales

contribuciones de la endocrinoterapia. Un ejemplo claro, lo representa el uso clínico de agentes capaces de imitar los efectos de las hormonas sexuales y que actúan como anticonceptivos.

Con el creciente aumento de la síntesis, utilización y combinación de sustancias análogas de las hormonas para el control de la natalidad ha crecido también la necesidad de contar con métodos analíticos apropiados para la identificación y cuantificación de estas sustancias; ya sea como compuestos puros, incluidos en una forma farmacéutica o incluso presentes en algún fluido biológico.

La química analítica tradicional, se ha basado en problemas de química inorgánica y de trabajos fáciles de separación y cuantificación, las cuales fueron siempre consideradas como operaciones secuenciales pero separadas una de la otra. Esto sin embargo, no resulta aplicable en un análisis de multicomponentes en el cual los procesos de separación y cuantificación se tratan de combinar, o en el que el paso de la separación se omite para realizar la cuantificación directamente.²

En realidad, los métodos de este tipo ofrecen crear ventajas prácticas en cuanto al tiempo de análisis e incrementando la exactitud. Los métodos de CG son un ejemplo en el cual los pasos de separación y cuantificación pueden ser combinados dentro de una simple operación. Aunque la ventaja es frecuentemente en el análisis de multicomponentes de formas farmacéuticas; existen muchos trabajos reportados en fluidos biológicos donde generalmente se monitorea un sólo componente y el análisis de multicomponentes es poco frecuente.

Las técnicas cromatográficas, desde su aparición hasta nuestros días, son uno de los recursos analíticos más valiosos con los que cuenta la industria químico farmacéutica para la identificación, separación y cuantificación de sustancias. El desarrollo de una gran cantidad de métodos analíticos por esta técnica se ha venido incrementando desde el último cuarto de este siglo.

Es por ello, que el empleo hoy en día de la cromatografía de gases en el análisis de sustancias exógenas o derivados sintéticos de estas han pasado de una mera etapa de investigación; a una etapa de desarrollo de métodos, que nos proporcionen una exactitud y rápido análisis para utilizarlos como métodos de rutina.

Como ya se mencionó el hecho de contar con métodos analíticos capaces de reunir determinadas características como pueden ser: rapidez, exactitud y facilidad de reproducir se hace cada vez más necesario, tanto por el constante desarrollo de la tecnología y por ende el incremento de la optimización de los procesos y los métodos analíticos.

Por lo anterior surge la necesidad de desarrollar un método analítico que nos permita cuantificar tanto a la noretindrona y mestranol en tabletas por cromatográfica de gases, presentando la ventaja de cuantificar ambos activos en una sola corrida cromatográfica, además de que el método de tratamiento de las muestras sea sencillo y seguro. Por otro lado para asegurar su utilización es necesario realizar la validación del mismo.

Por otro lado la industria farmacéutica en su continuo crecimiento, ha experimentado la necesidad del control de medicamentos por medio de métodos analíticos apropiados; es por este motivo que el objetivo del presente trabajo es el

desarrollo y validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de noretindrona y mestranol en tabletas anticonceptivas por cromatografía de gas-líquido (CGL).

Por último en base a las propiedades fisicoquímicas de la noretindrona y el mestranol y de su comportamiento cromatográfico, se puede desarrollar y validar un método analítico capaz de cuantificar a ambos activos en una sola corrida cromatográfica con la utilización de un estándar interno.

II. MARCO TEORICO

A. Desarrollo Histórico

La cromatografía tuvo sus comienzos en 1850 con la separación de anilinas por F. F. Runge. En este proceso se utilizó un filtro de papel y un solvente para lograr la separación de varios colorantes. Runge tomo como base la afinidad color-papel y la diferencia de peso molecular.

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente, el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de elución (fase móvil líquida) en un experimento que tenía por objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales; además con esta técnica presento la utilización de columnas de gas empacadas con un adsorbente adecuado para separar los pigmentos vegetales. A este proceso se le llamo cromatografía de tintas.^{3,4}

La cromatografía permaneció ignorada durante muchos años hasta que, en 1930, el investigador sueco Tiselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas diferentes a la técnica de elución, que son el "análisis frontal" y el "análisis por desplazamiento".

En 1941, Martin y Synge, en busca de una solución al problema de determinar cantidades pequeñas de aminoácidos, introdujeron la "cromatografía de reparto". Esta técnica evolucionó con rapidez, llegando a ser lo que ahora se conoce como cromatografía en papel y una versión limitada de cromatografía líquido-líquido en columna. Por otro lado,

estos mismos investigadores ya sugerían la posibilidad de utilizar un gas como fase móvil pero esto se quedó sólo en teoría y nunca se puso en práctica.

Fue hasta 1952, cuando Martin y James introdujeron la cromatografía de gases (CG). El instrumento que utilizaron consistía de una bureta automática para detectar y determinar los ácidos y bases. El primer cromatógrafo de gases detectaba solo estos dos grupos funcionales. El verdadero potencial no se pudo alcanzar hasta la publicación de Ray, del primer cromatograma, en 1954. El detector que se empleo fue el de conductividad térmica. Con esto surgía la necesidad de ampliar el uso de esta técnica, pero ahora la limitante lo constituían los detectores.

Ya desde 1948, surgió la necesidad de crear sistemas de detección apropiados para la entonces naciente técnica cromatográfica de gases. En 1956 Martin y James, desarrollaron el detector, de "balance de densidad del gas"; el cual poseía relativamente, alta sensibilidad y que se utilizó intensamente. Por otro lado, el sistema de detección de conductividad térmica (Claesson, 1946; Ray, 1954) ya constituía un detector de amplio uso, más sin embargo se limitaba a estudios donde las muestras fueran relativamente grandes. Mientras que el sistema de ionización de argón con una fuente de radio fue usado como un detector sensitivo con muestras de miligramos (Lovelock, 1958).²

El sistema de detección de ionización de flama con hidrógeno fue desarrollado con el trabajo de diferentes laboratorios en el periodo de 1957 a 1958, y este detector constituye a la fecha el detector de uso universal en trabajos cuantitativos con muestras del orden de 0.01 mcg.

B. Cromatografía

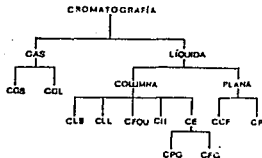
1. DEFINICION

La cromatografía es una separación física de dos o más compuestos, basada en la diferente distribución de dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra es móvil. En el caso particular de la cromatografía de gases el fluido es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al soporte sólido.³

2. CLASIFICACION

Existen diferentes maneras de clasificar al proceso cromatográfico como puede ser por:⁴

1. De acuerdo al mecanismo de separación involucrado
2. El estado físico de las fases



Métodos cromatográficos. CGS: Cromatografía Gas-Sólido; CGL: Cromatografía Gas-Líquido; CLS: Cromatografía Líquido-Sólido; CLL: Cromatografía Líquido-Líquido; CFQU: Cromatografía de Fase Químicamente Unida; CII: Cromatografía de Intercambio Iónico; CCF: Cromatografía de Capa Fina; CP: Cromatografía de Papel; CE: Cromatografía de Exclusión; CPG: Cromatografía de Permeación en Gel; CFG: Cromatografía de Filtración en Gel.

Figura 1. Clasificación del proceso cromatográfico de acuerdo al mecanismo de separación involucrado.

Si clasificamos la cromatografía por su mecanismo de separación (principios fisicoquímicos) tenemos:^{2,3}

a) Adsorción, basada en la polaridad de la mezcla y la fase estacionaria.

Los compuestos de la mezcla tienden a adsorberse al sólido (fase estacionaria) con diferente grado de intensidad de acuerdo a su polaridad, grupos funcionales, longitud de la cadena, etc..

Los compuesto de mayor polaridad se adsorben más fuertemente y migran a través del sistema más lentamente que los compuestos no polares o de menor polaridad.

b) Partición, el mecanismo de separación se basa en diferencia de solubilidades de los compuestos de una mezcla, entre dos fases no miscibles del sistema cromatográfico: la fase estacionaria y la fase móvil, que en este caso son líquidas. Este grado de solubilidades es comúnmente conocido, como coeficiente de reparto. La función del adsorbente en este tipo de cromatografía es servir, exclusivamente como soporte inerte para la fase estacionaria.

c) Intercambio Iónico. En este tipo de cromatografía la separación de los componentes se hace se acuerdo a la carga de la molécula y a la presencia de grupos reactivos ionizables existentes tanto en los compuestos a separar como en el soporte o fase estacionaria, en este caso se conoce como resina de intercambio iónico.

d) Exclusión o Filtración Molecular. Se basa en la separación que puede realizarse en una mezcla de acuerdo a las diferencias de pesos moleculares al penetrar a través de una capa de geles porosos.

En el tratamiento de los equilibrios (estado físico de las fases) y de la transferencia de masa se ha sugerido que debe preferirse la clasificación como se muestra en la tabla 1.

FASE MOVIL	FASE ESTACIONARIA	METODO CROMATOGRAFICO
GAS	LIQUIDO	GAS-LIQUIDO
LIQUIDO	LIQUIDO	LIQUIDO-LIQUIDO
LIQUIDO	SOLIDO	LIQUIDO-SOLIDO
GAS	SOLIDO	GAS-SOLIDO

Tabla 1. Clasificación del proceso cromatografico de acuerdo al estado físico de las fases.

En la cromatografía gas-líquido, los fenómenos de partición, influyen en la separación, además de la solubilidad, la temperatura, presión de vapor parcial del sólido en la solución.

En la cromatografía líquido-líquido, la separación se efectúa por partición, lo que dependerá de la solubilidad relativa del sólido en los dos líquidos inmiscibles.

En la cromatografía líquido-Sólido, la separación es por adsorción o bien una reacción reversible de intercambio de iones o formación de complejos.

En la cromatografía gas-sólido, la separación es por adsorción del compuesto en la estructura del soporte o por reacción química reversible.

C. Cromatografía de Gases

1. FUNDAMENTO

En la cromatografía de gases la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna. Los adsorbentes, tales como, carbón vegetal, gel de sílice y tamices moleculares (zeolitas sintéticas) son las fases estacionarias en la CGS. La adsorción diferencial sobre las superficie sólida es la base para la separación en la CGS. La CGS se utiliza principalmente para la separación de gases ligeros.^{2,3,4}

Los líquidos orgánicos de alto punto de ebullición constituyen la fase estacionaria en la CGL. La fase líquida se extiende como una película delgada sobre un sólido inerte llamado soporte sólido. La base para la separación es la partición de la muestra dentro o fuera de esta película líquida. Si se puede encontrar una fase líquida que tenga solubilidad selectividad para dos compuestos entonces estos dos pueden separarse mediante cromatografía de gases. Debido a la amplia gama de fases líquidas disponibles, la CGL es la forma más selectiva de la cromatografía y la que se presenta con mayores usos. En la figura 2, se presenta un esquema de la columna en la CGL.

La fase estacionaria está empacada dentro de una columna; el gas portador fluye continuamente a través de la columna. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre el gas portador y la fase orgánica líquida. Las muestras que son más solubles en la fase líquida permanecen menos tiempo en el

gas portador y por lo tanto se desplazan con mayor lentitud a través de la columna.

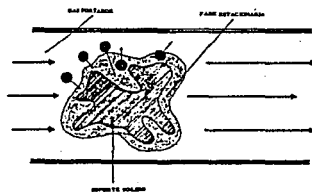


Figura 2. Representación esquemática de una columna cromatográfica.

En la cromatografía de gases se emplea el procedimiento de elución; donde la muestra se añade a la columna y el gas puro que actúa de portador fluye continuamente. Esta técnica tiene la ventaja de que los picos de la muestra están rodeados por un gas portador puro y cuando se concluye el análisis, la columna queda lista para otra muestra.

a. Proceso Cromatográfico

La muestra se coloca en una columna como un estrecho perfil de concentración (t_0). A medida que la muestra se reparte entre las dos fases y es arrastrada por el gas a través de la columna, ésta se extiende en una concentración de perfil gaussiano o de campana (t_1). Mientras más tiempo permanezca el compuesto en la columna más se ensancha el pico, es decir, se vuelve más corto y más grueso (t_2), conservando aún así su forma gaussiana. La representación esquemática del proceso cromatográfico se presenta en la figura 3.

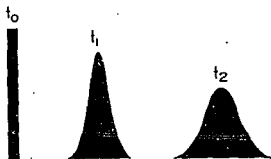


Figura 3. Representación esquemática del proceso cromatográfico.

b. Tiempo de Retención

En la cromatografía se dispone solamente de un parámetro característico en la identificación química de un compuesto en una muestra o sea el tiempo de retención, que es el lapso de tiempo que transcurre desde el punto de inyección al máximo del pico; en otras palabras constituye el tiempo que tarda una sustancia en atravesar y salir de la columna. Este tiempo es característico del soluto, de la fase líquida y de la temperatura de la columna. Por lo tanto, los tiempos de retención pueden usarse para identificar picos, ya que en condiciones controladas son reproducibles.

El tiempo de retención puede expresarse en varias formas. El tiempo de retención total se llama usualmente tiempo de retención absoluto, (T_{RA}). Este se compone de dos partes, el tiempo requerido solamente por el gas acarreador para desplazarse desde el punto de inyección al detector y el tiempo adicional debido a lo retenido en la fase líquida estacionaria. El primero de estos generalmente se denomina tiempo muerto o inerte (t_0).

El tiempo muerto es una característica del equipo y la columna en uso, es el mismo para todos los componentes y por esto carecer de significado en la identificación.

Con un detector de conductividad térmica el tiempo muerto puede determinarse extrayendo un poco de aire en la jeringa junto con la muestra. Si la columna no retiene el aire el final del tiempo muerto se marca en el gráfico con un pico. Con detectores de llama y de captura de electrones el pico del aire puede usarse como marcador pero será necesario una inyección más voluminosa y una sensibilidad alta por la escasa respuesta de estos detectores al aire.

Con la diferencia entre el tiempo de retención absoluto y el tiempo muerto obtenemos un nuevo termino llamado tiempo de retención corregido (T_{RC}). Esto también es característico de un componente dado trabajando bajo las mismas condiciones.

Para evitar muchos de los problemas de reproducibilidad, se usa con frecuencia el tiempo relativo de retención (T_{RR}). Este es la relación del tiempo de retención corregido del pico en cuestión con la de un pico conocido en la muestra, que se denomina como pico de referencia. Este procedimiento elimina los efectos de variaciones en el diámetro de la columna y su longitud, porcentaje de fase líquida, régimen de flujo del gas portador y cualquier otro parámetro que afecta a los dos picos en la misma forma. El material de referencia puede ser un componente normalmente presente en la muestra, o puede ser alguna sustancia agregada por el analista con este propósito. La elección del material de referencia, se hace arbitrariamente, se puede usar cualquier sustancia que este disponible, que tenga un buen cromatograma y un pico más o menos cercano al de interés, pero con buena resolución con respecto a los picos genuinos de la muestra.

El área del pico también forma parte integral de un reporte cromatográfico, con la cual se permite determinar la concentración de cada componente por separado en la columna. Este parámetro constituye la base del cálculo para el análisis cuantitativo de un compuesto.

c. Volumen de Retención Relativo

El volumen de retención, es el volumen de eluato requerido para eluir un compuesto en la columna, y viene dado por:

$$V_R = T_R F$$

Donde:

V_R = Volumen de retención

T_R = Tiempo de retención

F = Es el caudal de eluyente o fase móvil a las condiciones de operación seleccionadas

d. Posición del Pico

La posición del pico está determinada por la velocidad del flujo y el factor de capacidad k (relación de partición y la relación de distribución).

$$k = \frac{\text{g de la fase líquida}}{\text{g de la fase gaseosa}}$$

Esta es la relación de la cantidad de la muestra en las dos fases y se relaciona con el tiempo de retención mediante la ecuación :

$$t_R = t_o + t_o k$$

donde:

t_R = Tiempo de retención absoluto

t_o = Tiempo muerto

Como ya se menciona, el tiempo de retención es simplemente la suma del tiempo que la muestra pasa entre las dos fases: t_o , el tiempo en la fase móvil y t_R' , es el tiempo pasa en la fase estacionaria.

$$t_R = t_o + t_o k = t_o + t_R'$$

El Factor de Capacidad (k) puede relacionarse con el coeficiente de reparto K mediante la ecuación:

$$K = k B$$

donde B es la relación de fase:

$$B = \frac{\text{Volumen de gas}}{\text{Volumen líquido}}$$

Mientras que K , es el coeficiente de reparto o distribución y esta definido por:

$$K = \frac{\text{concentración de la muestra en fase líquida}}{\text{concentración de la muestra en fase gaseosa}}$$

K, es una constante termodinámica y mide la solubilidad de la muestra en fase líquida. Es característica de la muestra y de la fase líquida. Depende de la temperatura y al aumentar ésta generalmente disminuye K y reduce la solubilidad y el tiempo pasado en la fase líquida.

e. Retención Relativa (SELECTIVIDAD)

La retención relativa (α) es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase líquida, es decir la relación de t_R 's. Es también proporcional a los coeficientes de reparto.

$$\alpha = \frac{t_{R'}(2)}{t_{R'}(1)} = \frac{K(2)}{K(1)} = \frac{K(2)}{K(1)}$$

Si $\alpha = 1.0$ los dos picos tienen solubilidades idénticas y es imposible la separación. Mientras más elevados son los valores de alfa, mayor es la selectividad de la fase líquida y más fáciles las separaciones.

f. Ensanchamiento del Pico (PLATOS TEORICOS)

La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos, "N". Los platos teóricos miden el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que pasa a través de la columna. En la figura 4, se puede observar la medición de los platos teóricos a partir del cromatograma.

El número de platos teóricos es $16 (t_R/W_b)^2$, donde t_R es el tiempo de retención y W_b es la anchura de la base del pico y representa 4σ de un pico gaussiano. Con lo anterior se define un plato teórico como una sección de la columna en la que se establece un equilibrio de distribución entre el soluto y las dos fases.

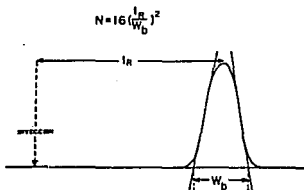


Figura 4. Medición de platos teóricos.

Algunos factores afectan el número de platos teóricos como son: tiempo de retención, longitud de la columna, temperatura de la columna, soluto, flujo, tamaño de la muestra, técnica de inyección, etc. El número de platos puede cambiarse variando estas condiciones.

La mayoría de los parámetros operacionales de la columna pueden evaluarse por su efecto sobre la altura equivalente a un plato teórico (AEPT):

$$AEPT = L/N$$

donde L = longitud de la columna (con frecuencia cm o mm). AEPT es la longitud de la columna necesaria para generar un plato teórico; mientras mayor sea el número de platos, más pequeña es la AEPT y más eficiente es la columna.

La ecuación de van Deemter es muy útil, ya que relaciona los parámetros operacionales de la columna con su eficiencia. En forma condensada tenemos:

$$H = A + B/\bar{u} + C X$$

donde:

H = AEPT

A = La difusión parasitaria o efecto del camino múltiple

B = Difusión molecular

C = Resistencia a la transferencia de masa

\bar{u} = Velocidad lineal media del gas.

Estos tres términos identifican los principales aportes a la dispersión del pico. La velocidad lineal media del gas (\bar{u}) puede determinarse a partir de:

$$\bar{u} = \frac{L \text{ (longitud de la columna, cm)}}{t_0}$$

En la figura 5, se muestra la representación esquemática de la ecuación de van Deemter, graficando AEPT en función de la \bar{u} se obtiene una hipérbola con un mínimo de AEPT. Este mínimo corresponde al flujo al que la columna funciona con máxima eficiencia. En esta figura también podemos ver el efecto aditivo de los tres factores que contribuyen a la altura del plato, H. A, es independiente del caudal; B disminuye cuando el caudal es más rápido y C se incrementa con un caudal mayor.

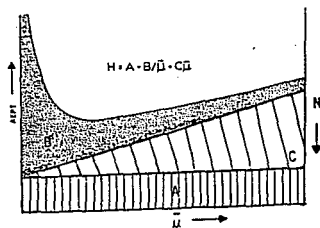


Figura 5. Representación de la ecuación de van Deemter.

1. Camino Múltiple (Difusión Parásita). En cualquier columna rellena habrá una serie de caminos de diferentes longitudes que atraviesan la columna. A medida que el gas portador y la muestra se desplazan a través de la columna, se distribuyen entre los diversos caminos. Puesto que la longitud de estos caminos es diferente, la moléculas de la muestra se mueven a distinta velocidad lineal; con todo este proceso las moléculas de la muestra habrán experimentado una dispersión gaussiana de su distancia lineal lo cual resulta de un pico más ancho. De este modo, los múltiples caminos accesibles a la muestra constituyen el ensanchamiento del pico y reducen la eficiencia de la columna. Este ensanchamiento depende del tamaño de partícula del relleno, la regularidad del relleno y, en menor grado, del diámetro de la columna. Para minimizar el término A (incremento de la eficiencia de la columna), habría que usar partículas pequeñas de tamaño uniforme y columnas de diámetro pequeño.

2. Difusión Molecular. Hay difusión en la fase móvil cuando el soluto molecular emigra desde la zona de alta concentración hasta las zonas de menor concentración. Este proceso de difusión resulta en una dispersión gaussiana que disminuye la eficiencia de la columna.

La cantidad de difusión es inversamente proporcional a la velocidad lineal media del gas, ya que un flujo más rápido significa un tiempo de difusión más breve.

Los procedimientos para disminuir el término B incluyen: caudales más rápidos (menor tiempo para la difusión); gas portador más denso, como el nitrógeno y el argón, y presión elevada dentro de la columna para inhibir la difusión.

g. Resistencia a la Transferencia de Masa

Las moléculas de la muestra deben transferirse de la fase gaseosa a la fase líquida; penetrar el líquido y difundirse a través de la película líquida; regresar a la superficie y volver nuevamente a la fase gaseosa. Por lo tanto, el término C es una función compleja de varios factores:

1. Espesor de la Película Líquida. Una película uniforme de poco espesor facilitará la transferencia de masa y evitara el efecto de dispersión del pico. El límite del espesor de la película esta determinado por el área de la superficie del soporte sólido y la actividad adsorbente del soporte sólido.

2. Difusibilidad en la Fase Líquida. Sería útil lograr una alta difusibilidad para que las moléculas de la muestra pudieran moverse más rápidamente. Con un líquido de baja

viscosidad, temperatura elevada en la columna y una muestra compuesta de moléculas de tamaño pequeño aumentara la difusibilidad.

3. Factor de Capacidad. Este termino presenta un máximo para $k = 1$ (un tiempo de retención que sea doble al del aire). Desciende rápidamente hasta cero cuando $k = 0$, pero en este caso especial sólo interesa en la cromatografía de muy alta velocidad. Comúnmente k tendrá un valor de 10 o mayor y mientras mayor sea k menor será el término C que produzca. Es difícil predecir el efecto del aumento de la temperatura de la columna. Al aumentar la temperatura aumentará el término B (difusión en la fase gaseosa) y disminuirá el término C por incrementarse la difusibilidad en la fase líquida. Si se aumenta un poco la temperatura se reducirá en gran medida la viscosidad de la fase líquida, sin que haya una reducción importante en los valores de k ; por lo tanto si se aumenta la temperatura mejorará la eficiencia de la columna. Sin embargo, el término k es el que más depende de la temperatura y esto al aumentar la temperatura suele aumentar el término C y, en consecuencia disminuye la eficiencia de la columna. Para reducir al mínimo el término C , deberá extenderse uniformemente una película delgada, de baja viscosidad, sobre un soporte inerte. El caudal debe ser bajo y el término k alto para conseguir una buena partición.

h. Resolución

La separación de dos picos uno con respecto de otro se mide por la resolución, R . La resolución está determinada por dos factores: Δt y W en la figura 6, se ilustran estos parámetros.

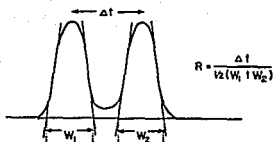


figura 6. Ilustración de los parámetros para el cálculo de la resolución.

Δt , es una medida de la separación de los máximos de dos picos; y puede incrementarse ya sea reduciendo la temperatura o escogiendo una fase líquida más selectiva (mayor α). Por otro lado, W_b promedio, es una medida de la eficiencia de la columna. Mientras que W_b , es la velocidad de ensanchamiento de banda en la columna y puede medirse por el número de platos teóricos, N o AEPT, este efecto se ilustra en la figura 7.

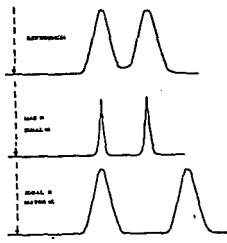


figura 7. Efecto del incremento de N y el incremento de

1. Componentes básicos de un Sistema Cromatográfico de CGL

En el cromatógrafo se utiliza un gas acarreador (fase móvil) que bajo presión mueve una muestra de vapor del puerto de inyección, a través de una fase estacionaria (columna) donde se efectúa la separación, luego pasa al detector donde se convierte en una señal eléctrica la cual puede medirse con un gráficasador.^{3,4}

1.1 Gas Acarreador

Los gases acarreadores más comunes son: helio, hidrógeno, nitrógeno y argón. La consideración más importante para seleccionar un gas acarreador es el tipo de detector que se va a usar. Además que debe de presentar las características de pureza alta, seco y ser inerte.

A pesar de su costo, el gas acarreador más adecuado es el helio. Hay dos razones principales para preferir su uso; uno, representa uno de los detectores de mayor uso universal dependen de la conductividad térmica del gas, y la del hidrógeno y el helio es mucho mayor que la de los otros. La segunda ventaja es que el helio y el hidrógeno, tienen una densidad muy baja con lo cual es posible emplear velocidades de flujo mayores, con lo que se puede disminuir el tiempo requerido para las separaciones. Por otro lado el hidrógeno tiene dos desventajas: es flamable y explosivo y sobre todo presenta reactividad hacia los componentes de la muestra reducible o no saturados. El gas acarreador debe de estar regulado para proveer una presión constante así como un flujo de masa constante. Se sugiere una presión mínima de 60 psi en el manómetro del cilindro.

Los gases mencionados anteriormente son inertes ante las sustancias de interes, pero no son lo suficientemente secos. Los gases comerciales graduados deben de secarse con una trampa de tamiz molecular que debe de colocarse entre el cilindro y el cromatógrafo (que se reacondiciona periódicamente calentándolo a 300 °C durante 4 horas con una corriente de gas que pasa por dicha trampa). El agua en el gas acarreador puede interferir en el material de empaque de la columna produciendo picos falsos o picos fantasmas.

2. Inyector

El inyector, se encuentra localizado en el frente o en la parte de arriba del instrumento y provee de un medio de introducción de la muestra a la corriente del gas acarreador y por consiguiente a la columna.

Un inyector que haya sido calentado vaporiza las muestras no gaseosas, por lo tanto la temperatura debe ser variable y encontrarse bajo control. El inyector tendrá que ser diseñado para permitir el uso de varios sistemas de inyección como por ejemplo, jeringas, pirolizadores, muestras sólidas, etc.

La técnica más utilizada para introducir las muestras es por medio de una jeringa graduada en microlitros a través de una septa de hule. Los inyectores más comunes son los de acero inoxidable, pero algunas veces este metal caliente producirá una degradación de la muestra. En el caso de este tipo de muestras, es necesario que el interior de la cámara metálica del inyector tenga una pared de vidrio, o se utiliza una columna de vidrio que se extiende del inyector a la septa.

Después de pasar del inyector, la muestra entra a la columna donde se efectúa el proceso de separación.

3. Columnas

La columna es la parte más importante del cromatógrafo y consta de tres elementos:

- 1) Un recipiente, que es un tubo de metal o vidrio.
- 2) Un soporte sólido.
- 3) Una fase estacionaria.

El tubo no interfiere en la separación cromatográfica excepto cuando una muestra puede reaccionar con él. Por ejemplo en el análisis de aguas un tubo de acero inoxidable adsorberá cierta cantidad de agua, y en el análisis de pesticidas, esteroides y compuestos similares, el tubo de metal puede interferir en el resultado del análisis. Los materiales que más se usan son: cobre, acero inoxidable y vidrio, el cual se utiliza cuando el metal no satisface las condiciones de análisis.

La separación de esteroides se ha venido realizando usualmente en columnas de vidrio de 6 y 12 pies de longitud y 3.6-4.0 mm de diámetro interno. La forma más común es un tubo de 6 pies en forma de U o tubo de 12 pies en forma de W, pero las columnas en espiral de 6 pies o más cortas también han sido utilizadas. La longitud de la columna es un parámetro muy importante que se encuentra estrechamente relacionado con la eficiencia de la columna; por ejemplo, una columna de 12 pies debería de tener aprox. 5000 a 6000 platos teóricos.

La principal razón por la cual se utilizan columnas de vidrio (las cuales deberan de estar silanizadas antes de su uso), es el de proporcionar una superficie inerte en y cerca

de la zona de vaporización, además de poder observarse el empacado.

Cuando se trabaja con columnas de vidrio empacadas la máxima presión de salida del gas debería ser aproximadamente 30 psi.

4. Soportes

Los soportes mas usuales y los que han dado mejores resultados son de tierra diatomácea calcinada, procesadas de tal manera para tener un tamaño de partícula pequeño y por ende que nos proporcione una gran superficie de contacto. Los tamaños de malla usuales para el trabajo con esteroides son entre 80-100 o 100-120. Aunque las fases muy polares pueden ser recubiertas directamente sobre el soporte, se hace necesario silanizar el soporte para desactivar la superficie. El mejor agente silanizante es el dimetildiclorosilano; el cual se prefiere más su utilización en lugar del hexadimetilsilano (HMDS). El uso de otros agentes silanizantes (N-trimetil-silimidazol (TSIM), bis trimetil-sililacetamida (BSA) y otros compuestos relacionados en realidad no es muy común.

Problemas como la baja resolución y la adsorción (coleo) son casi siempre debidas a la deficiente preparación de las columnas empacadas; y en particular a la mala desactivación de los soportes.

5. Fases Líquidas

La afinidad de la muestra con la fase estacionaria determina el tiempo que los compuestos individuales de la muestra permanecen en la columna. Los compuestos con menor afinidad emergen primero y los de mayor afinidad emergen al

último. Hay una gran variedad de materiales que se pueden usar como fases estacionarias y se clasifican en su naturaleza como polares y no polares. Unos ejemplos típicos son los detergentes, el hule de silicones, poliésteres y varios aceites y ceras.

Han sido pocas las fases estacionarias que presentan características satisfactorias para el trabajo con esteroides. Aproximadamente una docena de fases líquidas son las que en la actualidad han sido empleadas, pero sólo pocas de estas presentan una mayor frecuencia de uso. Las mejores fases no selectivas son polisiloxanos metil-sustituidos disponibles con los nombres de SE-30, JXR, y OV-1.

Algunas muestras corridas en OV-1 son algo más termoestables que esas mismas muestras corridas en SE-30, aunque ambos polímeros tengan la misma estructura básica.

La mejor fase polar para el trabajo con esteroides es la OV-17; este material es un polisiloxano del metilfenil conteniendo aproximadamente 50-55 moles-% de grupos fenilo. La temperatura máxima de operación de este polímero puede ser de aprox. 300 °C. Los efectos de retención selectiva son consecuencia de la insaturación carbono-carbono y por los grupos hidroxilo; los cuales su efecto es útil cuando se trabaja con trimetilsilil (TMSi) éter de esteroides polifuncionales ya que con OV-17 el esteroide TMSi éter antes que sus correspondientes grupos análogos de esteroides hidroxisustituidos.

Otras fases que pueden ser usadas para la separación de esteroides son; cianoetilmetil polisiloxanos (XE-60), poliésteres (NGS y CHDMS), fluoroalquilmetil polisiloxanos (QF-1) y p-cloro-fenilmetil polisiloxanos (F-60).

La QF-1 muestra un alto grado de selectividad estereoespecífica en la retención de esteroides hidroxil y ceto-sustituídos.

Polisiloxanos del tipo XE-60, han sido recomendados para algunas aplicaciones, pero ellos tienen una limitante la baja estabilidad térmica. El poliéster NGS es usado para trabajos con esteroides que tienen una estructura relativamente simple; la principal desventaja de los poliésteres también es su baja estabilidad térmica.

Los polímeros F-60 son esencialmente no selectivos y no se utiliza mucho en el trabajo con esteroides en comparación con SE-30 o OV-1. En la tabla 2, se muestra una lista de las fases más adecuadas para el trabajo con esteroides junto con una indicación de su temperatura máxima de operación. Todas estas fases pueden ser usadas por un corto periodo de tiempo a temperaturas de 30-50 °C abajo de su temperatura máxima de operación; conllevando finalmente a un incremento del porcentaje de sangrado y se acorta la vida media de la columna.

Naturaleza química	Abrev.	Temp. Máx. °C
No Selectivas:		
Polímero dimetilsiloxano	OV-1	320
Polímero dimetilsiloxano	SE-30	320
Polímero dimetilsiloxano	JKR	300
Polímero p-clorofenilmetilsiloxano	F-60	250
Selectivas:		
Polímero metilfenilsiloxano	OV-17	320
Polímero fluorooctilsiloxano	OF-1	235
Polímero cianetilmetilsiloxano	XE-60	235
Succinato de Neopentil glicol	NGS	225
Succinato de Ciclohexanodimetanol	CHDMS	235
Resinas epoxicas	Epon 1001	230

Tabla 2. Fases líquidas adecuadas para la separación de esteroides

7. Sistemas de Detección

Los compuestos deben detectarse cuando se separan en la muestra y emergen de la columna al detector.

El tipo de columna es, hasta cierto grado, un factor determinante en la elección de los detectores.

El papel del detector es el de indicar los momentos de salida de los componentes y de proporcionar indicación cuantitativa de los mismos. La acción del detector se traduce en una señal de tipo eléctrico, que posteriormente se amplificará e interpretará mediante un registrador gráfico o un integrador, que pondrán de manifiesto los aspectos cualitativos y cuantitativos de dicha señal.

En la tabla 3, se muestran las características deseables en un detector.

PRIMARIAS	SECUNDARIAS
1. SENSIBILIDAD	5. SIMPLICIDAD
2. RUIDO (señal de fondo)	6. COSTO
3. RESPUESTA	7. DISPONIBILIDAD
4. RANGO LINEAL	8. DURABILIDAD

Tabla 3. Características de un detector para C.G.

1. SENSIBILIDAD. Denota la cantidad de señal generada para determinada concentración de una muestra. La sensibilidad también puede medirse como la pendiente de la

gráfica de la respuesta del detector en función de la concentración de la muestra. La sensibilidad debe ser tal que no ocasione la introducción de ruidos, porque al trabajar con concentraciones muy bajas, es difícil encontrar un pico en el cromatograma diferente al producido por el ruido en la línea base.

2. RUIDO. Se refiere a la respuesta del detector de corta duración y al azar determinada por las propiedades eléctricas, la temperatura o la sensibilidad al caudal. Las señales de fondo determinarán el límite inferior de detección de los componentes, ya que por debajo del mismo se pueden confundir las señales del componente de una muestra y las de fondo. Por lo general se define como cantidad mínima detectable (c.m.d.) aquella muestra lo suficientemente grande para generar una señal dos veces mayor que su nivel de ruido.

3. RESPUESTA UNIVERSAL. Significa que el detector genera una respuesta para todos los componentes de una muestra, exceptuando el gas portador.

4. RESPUESTA SELECTIVA. Significa que el detector sólo responde a determinados tipos de compuestos; por ejemplo, el detector fotométrico de llama sólo responde a compuestos que contienen átomos de S o P.

5. RANGO LINEAL. Es la región sobre la cual la señal del detector es directamente proporcional a la concentración de la muestra.

Los dos detectores más importantes son el de conductividad térmica (CT), y el detector de ionización de flama (DIF); que representan un alto porcentaje de todos los detectores actualmente en uso. Para este caso particular los detectores

de mayor uso para el trabajo con esteroides son el detector de ionización de flama y el detector de captura de electrones.

A) Detector de ionización de flama (DIF)

En el detector de ionización de flama, el flujo del gas acarreador (nitrógeno comunmente empleado) se conduce directamente dentro de una flama de hidrógeno-aire o hidrógeno-oxígeno. Cuando la muestra pasa por la llama se quemán los compuestos orgánicos, y se obtienen partículas cargadas o iones positivos o negativos más electrones libres los cuales son recogidos por un par de electrodos colocados alrededor o encima de la flama; originando una corriente la cual es medida y amplificada continuamente con la ayuda de un electrómetro y la señal finalmente es dibujada como un pico sobre un registrador gráfico. En la figura 8, se muestra un diseño sencillo de este detector. La corriente que proporciona el flujo es pequeña y usualmente es en un rango de 10^{-9} a 10^{-12} amperios. La mayor ventaja de este detector es su alta sensibilidad, relativamente insensible a los cambios de caudal y temperatura y su rango lineal amplio (10^6); lo cual lo coloca como un detector de primera elección en el análisis cuantitativo de trazas.

El DIF responde a los compuestos orgánicos. Entre las sustancias que no dan respuesta figuran el aire, el agua, CO_2 , CS_2 , NO , SO_2 y H_2S . En general se hace apropiado para el análisis de trazas de materia orgánica en el aire o en el agua o de muestras acuosas como bebidas alcohólicas, materiales biológicos, etc.

No todos los compuestos orgánicos dan la misma respuesta, y los factores de respuesta deberían determinarse por medio del uso de sustancias de referencia con alta

pureza. Sin embargo hay que tener en cuenta que un factor de respuesta no es un factor de corrección.

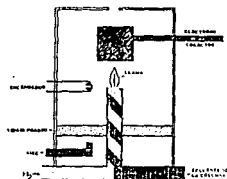


Figura 8. Esquema del detector de ionización de flama.

B) Detector de captura de electrones (DCE)

El detector más sensible que se usa actualmente es la celda de captura de electrones pero su campo de aplicación es limitado porque es muy selectivo. El detector de captura de electrones mide las disminuciones de una señal en vez de una corriente eléctrica, tal como lo muestra el esquema en la figura 9 . A medida que el gas portador fluye a través del detector, una lamina de tritio o de ^{63}Ni radioactivo ioniza las moléculas de nitrógeno y forma electrones lentos (baja energía). Al pasar por un par de electrodos con un voltaje apropiado estos electrones se desplazan hacia el ánodo produciendose una corriente constante que se amplifica por un electrómetro. Esta corriente llamada de "fondo" o "corriente permanente" es de unos 10^{-8} amperios. Si en ese momento se introduce en el detector una muestra que contenga moléculas que capturen electrones esa corriente se reducirá. La disminución de corriente es una medida de la cantidad y

afinidad electrónica de los compuestos de la muestra. Con una calibración apropiada, puede llegar a relacionarse la pérdida de la corriente con la concentración de la muestra.

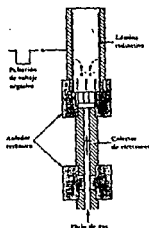


Figura 9. Esquema del detector de captura de electrones.

El detector de captura de electrones es muy sensible a ciertas moléculas, tales como haluros de alquilo, carbonilos conjugados nitrilos, nitratos y compuestos organometalicos. Por otro lado resulta virtualmente insensible a los hidrocarburos alcoholes y cetonas. En resumen, el detector responde selectivamente a las moléculas que contienen átomos electronegativos. Pocos esteroides muestran propiedades para ser detectados directamente por captura de electrones, en la practica lo conveniente es formar compuestos derivados de una estructura especial, que nos permitan detectarlos con este sistema. Entre otros podrían incluirse Cloroacetatos, Heptafluorobutiratos o Pentafluorofenilhidrazonas y clorodifluoroacetatos.

En este detector el rango lineal es limitado (500-10.000). Los detectores se saturan con facilidad (fácil contaminación) y hay que inyectar volúmenes de muestra muy

pequeños. Por otro lado las muestras deben de estar anhidras (solventes y gas acarreador) ya que las trazas de agua destruyen la respuesta normal del detector.

C) Otros sistemas

Existen otros tipos de detectores basados cada uno en diferente propiedad de medición así tenemos, el detector de conductividad térmica que se basa en el principio de que un cuerpo caliente perderá calor a una velocidad que depende de la composición del gas que lo rodea. El detector fotométrico de llama o detector de emisión de llama y los detectores termoiónicos entre otros son sistemas de detección demasiado selectivos y por lo tanto útiles cuando se trabajan muestras con características muy particulares. En general todos estos sistemas resultan inadecuados para el trabajo con esteroides.

1. VENTAJAS Y LIMITACIONES

1. Ventajas de la Técnica

Las principales ventajas de la cromatografía de gases son:³

Alta Resolución

La cromatografía de gases puede generar miles de platos teóricos en muy poco tiempo. Los isómeros con puntos de ebullición muy próximos que no pueden resolverse por destilación se separan fácilmente mediante la cromatografía de gases. Con la existencia de una gran gama de fases estacionarias, y por ende de polaridades, se puede escoger entre ellas, lo que confiere variedad a la gama de muestras que puede manejarse.

Velocidad

El análisis por CG tarda unos minutos. Con altas precisiones se han terminado análisis en apenas unos segundos. Sin embargo, en la mayoría de los análisis de laboratorio este ahorro en tiempo no reduce apreciablemente el tiempo total involucrado en la preparación de la muestra, el análisis cromatográfico y el cálculo de los resultados. En consecuencia no se ha tomado en consideración la gran rapidez de estos análisis.

Sensibilidad

La sensibilidad que presentan los detectores de más amplio uso en gases es muy alta; ya que por ejemplo el detector de conductividad térmica puede fácilmente medir mcg.

El detector de ionización de flama mide nanogramos (10^{-9} g), y los detectores más selectivos como el de captura de electrones y el fotométrico de llama alcanzan a medir los picogramos (10^{-12} g).

Debido esta alta sensibilidad, la CG resulta ser un método preferido para el análisis de trazas, particularmente plaguicidas, herbicidas y contaminantes orgánicos del aire y del agua. Otra ventaja de esta gran sensibilidad es la pequeñez de la muestra requerida.

Sencillez

Tanto la técnica como el instrumento de la cromatografía de gases son relativamente sencillos y fáciles de comprender y dominar.

Cuantitativa

Una de las mayores ventajas de la CG es que permite obtener muy buenos resultados cuantitativos. Sin embargo, diremos solamente que se puede obtener buena exactitud en una amplia gama de concentraciones de la muestra, desde miligramos hasta nanogramos.

2. Limitaciones

Muestras Volátiles

Todas las muestras que se analicen deberán ser volátiles; de lo contrario no pasaran a través de la columna. Con la CG es difícil tratar compuestos iónicos, compuestos de elevada polaridad y compuestos de peso molecular superior a 600.

Eliminación de Interferencias

Muestras complejas como las de la orina, grasa de pollo o agua de río no pueden inyectarse directamente en una columna de CG. Estas muestras deben purificarse con disolventes o mediante cromatografía en columna, para eliminar las sales y los compuestos de peso molecular elevado. Si se llegaran a inyectar estas muestras en una columna de CG, no tardaría en obstruirse y disminuiría la velocidad de flujo.

Técnica Cualitativa Deficiente

La CG es un buen método cuantitativo, pero un método cualitativo deficiente. Por lo general, para identificar las muestras se comparan los tiempos de retención de sustancias de referencia y muestras conocidas. Así no es posible afirmar con exactitud la identidad de una muestra debido a que varios compuestos pueden tener los mismos tiempos de retención, bajo las mismas condiciones de trabajo.

Técnica Preparativa Deficiente

La CG funciona bien con miligramos y microgramos de muestra, pero es muy difícil manipular cantidades de un gramo o mayores. Las columnas normales de CG se sobrecargan con muestras de 10 miligramos.

D. Validación de Métodos Analíticos

En los últimos años, se han venido realizando muchos cambios significativos en la forma de apreciar y conseguir que un método analítico desarrollado, sea evaluado o validado para comprobar su confiabilidad y funcionalidad.

En nuestros días los conceptos de validación, así como de control de calidad y de las buenas practicas de manufactura son sin duda herramientas muy importantes que nos permiten, validar un método o proceso y en general asegurar la calidad de un producto.⁵

Tal es la importancia, de la practica de la validación que la FDA considera dentro de sus lineamientos que todo método o proceso que no este validado esta fuera de control.

El empleo de una técnica analítica implica un riesgo si dicha técnica no ha demostrado ser confiable. En muchas ocasiones se presenta el problema de seleccionar la técnica analítica más apropiada para la determinación de un compuesto.

La validación de un método analítico algunos la definen como una determinación a través de varios procedimientos experimentales documentados, del grado de validez de un proceso de medición. Esta definición sugiere una actividad que toma lugar después de que el proceso de medición se ha realizado. Si la evaluación es satisfactoria, el método recibirá confirmación o aprobación oficial.

Existen muchas formas de validar un método analítico, ya que hay una gran variedad de experimentos, que pueden ser utilizados para tal fin.

El seleccionar cuales serán los puntos para validar un método analítico depende generalmente de la aplicación que tenga el método, de las necesidades particulares de cada laboratorio, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de la persona que lo realiza.

Los parámetros a los que generalmente son sometidos los métodos en una validación son:

LINEALIDAD
EXACTITUD
PRECISION
RANGO LINEAL
LIMITE DE DETECCION
LIMITE DE CUANTIFICACION
ESPECIFICIDAD
TOLERANCIA

1. Parámetros

LINEALIDAD

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado. También algunos la definen como el grado en el cual una curva de calibración se aproxima a una línea recta, o el grado en el cual la sensibilidad es constante.^{6,7}

Linealidad del Sistema

Se determina, construyendo una curva de calibración (cantidad adicionada vs. cantidad recuperada) de una misma solución estándar utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución, estableciendo con esto el rango analítico.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para propósitos de control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluido el 100 % de la dosis.

Criterios de aceptación

$$b \text{ aprox.} = 0, \quad r \geq 0.99, \quad r^2 \geq 0.98$$

Para métodos microbiológicos $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$

Linealidad del método

Se determina con placebos adicionados del principio activo, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, cuando menos a 3 diferentes concentraciones incluyendo el 100 %, realizando el análisis por triplicado de cada concentración. En el tratamiento matemático de los resultados obtenidos se calcula la curva de regresión por medio del método de mínimos cuadrados.

La extensión del estudio dependerá del uso y aplicación del método, (Control de Calidad y Estabilidad) y se llevará a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterios de aceptación

Cantidad adicionada vs. cantidad recuperada:

$$m \text{ aprox.} = 1, \quad b \text{ aprox.} = 0 \quad \text{y} \quad r^2 \geq 0.98$$

Por ciento recuperado: en el intervalo de confianza al 95% para la media deberá localizarse el 100 %.

RANGO LINEAL

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia de interés (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito. El rango normalmente es expresado en las mismas unidades de concentración que las muestras por ejemplo mcg/ml, mg/ml, etc..

EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (que generalmente es el 100 % de recobro de lo etiquetado). Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Exactitud al 100 %

Se debe cuando menos analizar 6 placebos cargados con el 100 % del principio activo, de manera independiente, por un mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Criterios de aceptación

El Intervalo de Confianza al 95% para la media, deberá incluir el 100 %.

Si en el momento de hacer la linealidad del método se trabajan diferentes concentraciones cuando menos por quintuplicado, la exactitud del método se puede determinar de los valores de linealidad.

PRECISION

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un sólo analista; por lo cual esta íntimamente relacionado con la dispersión de los resultados.

b) Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes con variaciones en las operaciones, como por ejemplo determinaciones realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en

diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

Precisión (Repetibilidad)

Se realiza con el análisis repetido de una muestra homogénea. La precisión es expresado usualmente como el porcentaje relativo de desviación estándar (DSR %)

Criterios de aceptación

Se calcula la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de los datos de linealidad y exactitud. Si el CV es menor de 2.0 % el método es aceptable.

Precisión (Reproducibilidad)

El método se aplica a muestras analizadas por lo menos por dos analistas en dos días diferentes y por triplicado cada muestra. Trabajando de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto cercano al 100 % de la concentración teórico.

Criterios de aceptación

Se determinará la desviación estándar de los porcentos de recobro, y debe de cumplir con los requerimientos para los cuales el método será utilizado.

METODO	C.V.
Cromatográfico	2 %
Químicos y Espectrofotométricos	3 %
Microbiológicos	5 %

LIMITE DE DETECCION

Es la mínima concentración de una sustancia de interés en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las mismas condiciones experimentales establecidas. Este parámetro, generalmente se controla cuando se trata de métodos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos, debido a que estos se encuentran en cantidades muy pequeñas. Sin embargo puede ser aplicable en métodos analíticos para formas farmacéuticas cuando las sustancias a ser determinadas se encuentran en pequeñas cantidades y su extracción es difícil de realizarse por haber otras sustancias que lo impidan. El límite de detección se expresa generalmente como concentración de la sustancia en la muestra o como porcentaje de lo etiquetado.^{5,6,7}

La determinación del límite de detección de un método analítico varía si se trata de un procedimiento instrumental o no instrumental.

Para procedimientos instrumentales pueden utilizarse diferentes técnicas. Algunos investigadores determinan la razón entre la señal y el ruido, comparando los resultados de muestras de concentración conocida con resultados de muestras blanco obteniendo de esta manera la cantidad mínima que puede ser detectada con certeza. Una razón entre señal/ruido de 2:1 o 3:1 generalmente es aceptable.

Otros miden la magnitud de la señal analítica de fondo, analizan muestras blanco y calculan la desviación estándar de las respuestas. La desviación estándar multiplicada por un factor, generalmente 2 o 3, proporciona la estimación del límite de detección.

Para métodos no instrumentales, el límite se calcula por el análisis de muestras de concentración conocida estableciendo el nivel mínimo al cual la sustancia de interés puede ser detectada con certeza.

LIMITE DE CUANTIFICACION

Es la menor concentración de una sustancia que puede ser determinada (cuantificada) en una muestra con niveles de precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidos. Es un parámetro cuantitativo para muestras que contienen niveles bajos de otras sustancias, tales como, impurezas en materias primas y productos de degradación en productos farmacéuticos. El límite se expresa generalmente en concentración de la sustancia en la muestra o como porcentaje de lo etiquetado.

El procedimiento más común para métodos instrumentales, consiste en determinar la magnitud de la respuesta de fondo analizando muestras blanco y calcular la desviación estándar multiplicada por un factor, usualmente 10, proporcionando una estimación del límite de cuantificación.

Para métodos no instrumentales el límite de cuantificación se determina, analizando muestras de concentración conocida y estableciendo el nivel mínimo al cual la sustancia de interés puede ser cuantificada con aceptable precisión y exactitud.

ESPECIFICIDAD

Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de) en el análisis de muestras complejas. Representa la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

La especificidad de un método analítico puede determinarse comparando los resultados obtenidos de muestras que contienen impurezas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o los ingredientes del placebo; con los resultados de muestras que no contienen estas posibles interferencias.

Especificidad en Estabilidad

La especificidad en estabilidad es un aspecto importante de los métodos analíticos para evaluar la estabilidad de una sustancia en la forma farmacéutica. Por lo que un método analítico indicador de estabilidad debe demostrar su capacidad para separar el activo intacto de aquellos compuestos que pueden interferir.

El trabajo experimental requerido para establecer la especificidad en estabilidad, sería como sigue, realizandolo lo más completo posible:

1. Probar el método con placebos del producto para asegurarse que no haya interferencias de los excipientes con en activo.
2. Seleccionar de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del activo cuales serían sus posibles vías de degradación en términos de temperatura, luz, humedad, etc.,

para acelerar cualquier reacción en la formulación que pueda indicar inestabilidad.

3. Analizar inicialmente muestras del activo, del placebo y de la formulación, y posteriormente someterlas a condiciones de degradación establecidas por periodos de tiempo, para obtener descomposición si esta es posible en tales condiciones.

4. Analizar las muestras nuevamente, una vez transcurrido el tiempo de almacenamiento bajo las condiciones de degradación.

5. Si los productos de degradación esperados son conocidos, y además se dispone de ellos, añadirlos al placebo almacenado, y Analizar estas muestras para determinar el grado al cual el método es específico con respecto a ellos, comparando los resultados con los obtenidos en el análisis de las muestras almacenadas.

5. En caso de no disponer de los productos de degradación por separado, simplemente establecer si se presentan interferencias en el análisis de las muestras (activo, placebo y formulación) almacenadas.

Criterio de aceptación

Si el experimento demuestra que la señal analítica solo se debe a la sustancia de interés, el método se llamara específico y podra ser utilizado como indicador de estabilidad.

En el caso contrario, se deberá estimar el efecto de las "otras sustancias" sobre la señal analítica y se estimara en cuanto y cuando este efecto podría ser importante.

TOLERANCIA

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

La tolerancia de un método analítico puede ser determinada analizando alicuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas; usando condiciones operacionales y del medio ambiente diferentes entre si, pero acordes con las especificadas en el método.

Esta reproducibilidad puede ser comparada con la precisión del método bajo condiciones normales para obtener una medida de la tolerancia.

2. Categorías de Métodos Analíticos

Considerando la variabilidad de ensayos es lógico que los diferentes métodos analíticos requieran diferente esquema de validación. Como ya se menciona el escoger cuales serán los parámetros para validar un método depende de diferentes circunstancias en los que se encuentra la aplicación que tenga el método a demás de los requerimientos oficiales. Las categorías de métodos analíticos más comunes que requieren ser validados son:⁶

CATEGORIA I. Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o

ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

CATEGORIA II. Métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

- a) Análisis cuantitativo
- b) Pruebas límite

CATEGORIA III. Métodos analíticos para determinar características físicas (por ejemplo disolución, liberación del principio activo).

Para cada una de las categorías se requiere diferente información analítica, en la tabla 4, se enlistan los parámetros básicos requeridos para cada una de estas.

PARAMETRO ANALITICO	CATEGORIA II			
	CATEGORIA I	Análisis cuantitativos	pruebas límite	CATEGORIA III
precisión	si	si	no	si
exactitud	si	si	*	*
lím. de detección	no	no	si	*
lím. de cuantificación	no	si	no	*
especificidad	si	si	si	*
rango	si	si	*	*
linealidad	si	si	no	*
tolerancia	si	si	si	si

* puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de un ensayo en específico.

Tabla 4. Parámetros elementales requeridos en ensayos de validación de métodos analíticos

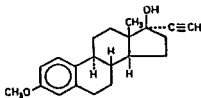
E. MONOGRAFIA**MESTRANOL**

NOMBRE QUIMICO. 3-methoxy-19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yn-17-ol. También conocido por los siguientes nombres químicos :
sinónimos: 6,7,8,9,10,11,12,13,14,15

- 19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yn-17-ol, 3-methoxy-(17 α)-3-methoxy
- 19-nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trien-20-yn-17-ol
- 3-Methoxy-19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yn-17 α -ol
- 17 α -ethynylestradiol-3-methyl ether
- 17 α -ethynyl-3-methoxy-1,3,5(10)-estra-trien-17 β -ol

NOMBRES GENERICOS:

Mestranol
Norquen
Ovastol



Fórmula Condensada



Peso Molecular

310.44

Pureza

Contiene no menos del 97 por ciento y no más del 102.0 por ciento de $C_{21}H_{26}O_2$ calculada sobre base seca.

Descripción

Polvo cristalino blanco o blanco amarillento, inodoro

Identificación

A. El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio, exhibe máximas solamente a las mismas longitudes de onda que las de una preparación similar de la sustancia de referencia de mestranol.

B. Disolver 2 mg de la muestra en 2 ml de ácido sulfúrico: la solución es de naranja rojizo con luz transmitida; tiene fluorescencia amarilla verdosa con la luz reflejada y da positiva las siguientes reacciones:

a) A 1 ml de la solución anterior agregar 1 gota de solución de sulfato férrico amónico y 2 ml de agua, aparecera un precipitado café rojizo; b) a 1 ml de la misma solución, agregar 2 ml de agua, aparecera un precipitado floculento color rosa-rojizo.

Solubilidad

Prácticamente insoluble en agua

Soluble 1 en 44 de alcohol (96%)

Soluble 1 en 23 de acetona y de éter

Soluble 1 en 4.5 de cloroformo

Soluble 1 en 12 de dioxano

Ligeramente soluble en metanol

Punto de Fusión

Entre 146 y 154° C pero la variación entre el inicio y el final de la fusión, no debe exceder de 4° C.

Perdida por Secado

Secar durante 3 horas a 105° C, no debe de perder más del 1% en peso.

Valoración

Solución reveladora: Solución de metanol-ácido sulfúrico preparada de la siguiente manera:

En un matraz volumétrico de 100 ml, colocado en un baño de hielo, depositar 30 ml de metanol. Agregar lentamente con precaución y agitación continua, alrededor de 65 ml de ácido sulfúrico cuidando que la temperatura permanezca abajo de 15 °C. Dejar que la solución tome la temperatura ambiente y diluir con ácido sulfúrico a su volumen.

Preparación de la solución de referencia. Pesar y disolver una cantidad de sustancia de referencia previamente seca por 3 horas a 105° C, en cloroformo y diluir cuantitativamente poco a poco, para obtener una solución de concentración conocida de aproximadamente 5 mcg/ml.

Preparación de la solución de la muestra. Pesar aproximadamente 20 mg de la muestra, previamente seca por 3 horas a 105° C disolver en cloroformo hasta 200 ml y mezclar. Tomar una alícuota de 5 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 100 ml llevar a volumen con cloroformo y mezclar.

Procedimiento. Tomar una alícuota de 4 ml de cada una de las soluciones de referencia y de la muestra en matraces yodométricos Erlenmeyer. Evaporar a sequedad las soluciones con corriente de aire suave, sin calentar. Disolver el residuo en 0.3 ml de metanol. Mantener los matraces en Baño María a 25° C y agregar en cada uno 10 ml de la solución de metanol-ácido sulfúrico. Mantener tapados los matraces y después de 6 minutos de la adición del reactivo, determinar concomitantemente las absorbancias de las soluciones de la referencia y de la muestra a una longitud de onda de 545 nm utilizando una solución de metanol-ácido sulfúrico como blanco. Calcular la cantidad en mg de $C_{21}H_{26}O_2$ en la muestra, por medio de la fórmula: $4C (Am/Aref)$ en donde C es la concentración en mcg/ml de la Sref del mestranol y Am y Aref son las absorbancias de la solución de la muestra y de la referencia respectivamente.

Conservación: En recipientes bien cerrados y protegidos de la luz.

NORETINDRONA

NOMBRE QUIMICO. 17-hidroxy-19-norpregn-4-en-20-yn-3-one.

También conocido por los siguientes nombres químicos:

Sinónimos 6,7,8,9,10,11,12,13,14,15

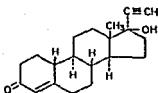
- a. 19-nor-17 α -ethynyltestosterona
- b. 17 α -ethynyl-19-nortestosterona
- c. 19-nor-17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4-androsten-3-one
- d. 19-nor-17 α -ethynylandrosten-17 β -ol-3-one
- e. 19-norethisterone
- f. Anhydrohydroxynorprogesterona
- g. Norpregneninolona

NOMBRES GENERICOS:

Noretindrona

Conceplan

Noriday



Fórmula Condensada

 $C_{20}H_{26}O_2$

Peso Molecular

298.42

Pureza

Contiene no menos del 97.0 por ciento y no más del 102.0 por ciento de $C_{20}H_{26}O_2$ calculada sobre base seca.

Descripción

Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento, inodoro, no higroscópico, con sabor ligeramente amargo.

Identificación

A. El espectro de absorción en la región infrarrojo de una solución (7 en 100) de la muestra disuelta en cloroformo, tendrá máximos solamente a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de la sustancia de referencia de noretindrona; utilizando celdas de 0.1 mm.

Solubilidad

Prácticamente insoluble en agua
Soluble 1 en 80 de acetona
Soluble 1 en 400 de éter
Soluble 1 en 15 de cloroformo
Soluble en dioxano

Punto de Fusión

Entre 202 y 208° C.

Perdida al Secado

Cuando se seca a 105 °C por 3 horas, no debe de perder más del 0.5% en peso.

Grupo Etililo. Entre 8.18 y 8.43 por ciento. Disolver 200 mg de la muestra en 40 ml de tetrahidrofurano; agregar 10 ml de una solución al 10 por ciento m/v de nitrato de plata y titular potenciométricamente con solución 0.1 N de hidróxido de sodio; utilizar electrodos de vidrio y calomel siendo este último del tipo fibra estándar pero conteniendo solución de nitrato de potasio como electrólito. Hacer una determinación en blanco y efectuar las correcciones necesarias. Cada ml de solución 0.1 N de hidróxido de sodio equivale a 2.503 ml del grupo etinilo ($-C\equiv CH$).

Valoración

Pesar 100 mg de la muestra y disolver cuantitativamente con alcohol para obtener una solución que contenga aproximadamente 10 mcg/ml. Preparar una solución de la sustancia de referencia disuelta en alcohol para obtener una concentración aproximadamente de 10 mcg/ml. Determinar las

absorbancias de ambas soluciones en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción (240nm), utilizando alcohol como blanco. Calcular la cantidad en mg de $C_{20}H_{26}O_2$ en la muestra utilizando la siguiente formula: $10 C (A_m/A_{ref})$; en la que C es la concentración de la solución de referencia en mcg, A_m y A_{ref} son las absorbancias obtenidas con la solución de la muestra y con la solución de referencia, respectivamente.

Conservación: En recipientes bien cerrados y protegidos de la luz.

TABLETAS DE NORETINDRONA Y MESTRANOL**Pureza**

Las tabletas de noretindrona y mestranol no deben de contener menos del 90.0 % y no más del 110.0 % de la cantidad etiquetada de noretindrona y mestranol.⁶

Identificación

Desintegrar una tableta en 1 ml de alcohol dentro de un tubo de ensayo de 15 ml y centrifugar. Aplicar 10 mcl de esta solución y 10 mcl de cada una de las soluciones estándar preparadas a una concentración de 1 mg/ml de estándar de noretindrona y aproximadamente 50 mcg/ml de estándar de referencia de mestranol, ambas preparadas en alcohol en una placa cromatográfica a una distancia de 2.5 cm de la base de la placa y previamente activada por calentamiento a 105°C por 30 minutos. Desarrollar el cromatograma con una mezcla de volúmenes iguales de acetato de etilo y ciclohexano como fase móvil hasta que el frente del solvente recorra aproximadamente 15 cm. Retirar la placa, secar al aire y observarla bajo luz ultravioleta: la mancha principal de la muestra se observa al mismo valor de Rf que la mancha de la solución de referencia de noretindrona (aprox. 0.6). Rociar la placa con la solución de ácido sulfúrico-metanol preparada como lo marca en la monografía de mestranol (pág. 50), y calentar la placa a 105 °C por 10 minutos: la mancha rosa de la solución de prueba aparecera al mismo valor de Rf que la mancha rosa de la solución de referencia de mestranol (aprox. 0.8).

Disolución

Aparato: PALETAS (USP II)

Medio de disolución: Mezcla de ácido clorhídrico 0.1 N y alcohol isopropílico (97:3); 600 ml.

Velocidad: 75 rpm.

Tiempo: 60 minutos.

Determinar la cantidad de noretindrona y mestranol empleando el siguiente procedimiento:

Fase móvil: Mezcla de acetonitrilo-agua (60:40) (filtrada y degasificada).

Sistema cromatográfico: Cromatografo de líquidos equipado con un detector de longitud de onda variable a 254 nm para la noretindrona y a 200 nm para mestranol y una columna de 4 mm X 15 cm, C18 de 5 o 10 micras. El flujo sera de 1 ml por minuto. Preparar soluciones de referencia de noretindrona y mestranol disueltos en medio de disolución a una concentración similar a la cantidad que correspondería al 100 % disuelto de la muestra. Inyectar las soluciones estándar, calculando la desviación estándar la cual no debe de ser mayor al 2 %. El número mínimo de platos teóricos para el pico de mestranol sera de 4000, y el volumen mínimo de retención para la noretindrona sera de 2.4 ml.

Inyectar separadamente volúmenes iguales (aprox. 200 ml) de las soluciones de referencia y de las muestras (previamente filtradas) y obtener los cromatogramas. Calcular las cantidades disueltas de noretindrona y mestranol

comparando la correspondiente respuesta de los picos de las soluciones de referencia y la muestra.

Tolerancia. No menos del 50 % (Q) de noretindrona y 75 % (Q) de mestranol en 60 minutos.

Valoración

Fase móvil: Mezcla de acetonitrilo-agua (50:50) filtrada y degasificada.

Solución de estándar interno: Transferir aproximadamente 80 mg de progesterona en un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de acetonitrilo y llevar a volumen con agua y mezclar.

Solución concentrada de mestranol: Disolver una cantidad exactamente pesada de estándar de mestranol, en acetonitrilo y diluir cuantitativamente con acetonitrilo para obtener una solución de concentración aprox. de 0.05 mg/ml.

Solución concentrada de noretindrona: Disolver una cantidad exactamente pesada de estándar de noretindrona en acetonitrilo para obtener una solución de concentración de aprox. 1 mg/ml.

Preparación de la mezcla estándar: Transferir 2.0 ml de la solución de estándar interno dentro de un matraz volumétrico de 100 ml. Adicionar cantidades iguales de las soluciones concentradas de referencia de noretindrona y mestranol para obtener una concentración final, en mg/ml correspondiente a 1/15 de la cantidad etiquetada de los componentes de la tableta. Adicionar 50 ml de agua, diluir con acetonitrilo y llevar a volumen.

Preparación de la muestra: Transferir 10' tabletas de noretindrona y mestranol a un matraz volumétrico de 250 ml,

adicionar 50 ml de agua y agitar vigorosamente hasta que las tabletas se hayan desintegrado completamente. Adicionar 10 ml de la solución de estándar interno y 165 ml de acetonitrilo y mezclar. Llevar al ultrasonido por aproximadamente 2 minutos y diluir con acetonitrilo a volumen. Dejar sedimentar las partículas sólidas o centrifugar si es necesario para obtener una solución clara. Transferir 5.0 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 10 ml, adicionando 1 ml de acetonitrilo y diluir a volumen con agua.

Sistema cromatográfico: Cromatografo de líquidos equipado con detector a 200 nm y una columna de 4.6 mm X 15 cm, C8 con tamaño de partícula de 5 o 10 micras. La velocidad de flujo es de 1 ml/min. Inyectar la solución mezcla de noretindrona y mestranol la cual debe de dar la siguiente respuesta: la eficiencia de la columna para el mestranol no es menor de 6000 platos teóricos, la resolución entre los picos de la progesterona y mestranol no debe de ser menor a 5.0 y la desviación estándar relativa de 6 inyecciones repetidas no debe de ser mayor del 2.0 % (ambos picos).

Procedimiento: Inyectar separadamente volúmenes iguales (aprox. 25 μ l) de la solución estándar y de la solución muestra, obtener los cromatogramas. El T_R relativo es aprox. 2.5 min. para el mestranol y 1.0 min. para la noretindrona. Calcular la cantidad en mg de noretindrona y mestranol recuperados por cada tableta. Por la siguiente fórmula:

$$50 C(Ru/Rs),$$

en la cual C es la concentración en mg por ml, de la solución mezcla de estándar, y Ru y Rs es la relación de la respuesta, obtenidos para la muestra y la solución de estándar, respectivamente.

1. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

Indicaciones: Prevención del embarazo, hipermenorrea e hirsutismo.^{1,16}

La administración de esta combinación produce efectos estrogénicos y progestínicos por su contenido de mestranol y noretindrona, respectivamente; la noretindrona tiene una débil acción androgénica directa. Este medicamento inhibe la secreción hipofisiaria de las hormonas foliculo estimulante y luteinizante y suprime la ovulación, modifica el moco cervical haciendolo viscoso e impenetrable a los espermatozoides, altera el transporte tubario y la nidación. El efecto combinado de estas acciones determina su gran eficacia en la prevención del embarazo (99.9 % de eficacia teórica y 97.5 % de eficacia en uso). Corrige la hipermenorrea debida a un exceso de estrógenos o a una deficiencia de progestinas. El endometrio que se ha vuelto secretor bajo las acciones combinadas de estrógenos y progestinas, cuando disminuye rápidamente las concentraciones sanguíneas de estos agentes, se produce el sangrado menstrual. Tiene un doble efecto antiandrogénico indirecto: disminuye la secreción ovárica de andrógenos, por inhibir la secreción de gonadotrofinas, e inhibe la 5-alfa-reductasa, enzima de los tejidos andrógeno-sensibles, que convierte a los andrógenos inactivos (testosterona) en andrógenos activos (dihidrotestosterona).

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. ANTECEDENTES

Desde la aparición de ambas hormonas, se ha tenido la necesidad de contar con algún método capaz de identificar y cuantificar a estas.^{8,9,10}

Primeramente se utilizaron métodos analíticos para la cuantificación como materia prima entre los que figuran métodos para el caso del mestranol; por desarrollo de color y posterior cuantificación espectrofotométrica,¹¹ por disolución en una mezcla de metanol-ácido sulfúrico y determinación espectrofotométrica,^{11,17,18} titulación volumétrica en medio no acuoso,¹⁹ por cromatografía descendente en papel,²² y para la noretindrona se tienen métodos por disolución en alcohol y cuantificación espectrofotométrica directa,¹⁹ titulación volumétrica con solución de hidróxido de sodio y detección potenciométrica²¹ y por cromatografía descendente en papel entre otros.²²

Posteriormente y con la aparición de la formulación de tabletas combinada surgía nuevamente la necesidad de crear métodos analíticos capaces de identificar y cuantificar ambos esteroides por separado y además de buscar que los excipientes no interfirieran en la cuantificación;¹² fue entonces que se desarrollaron métodos como de cromatografía en columna y posterior cuantificación espectrofotométrica directa^{22,23} o reacción de desarrollo de color previa,^{24,25} extracción del mestranol con ciclohexano seguida por separación en cromatografía en capa fina, desarrollo de color

y determinación espectrofotométrica,^{28,29} por cromatografía de partición y posterior análisis por espectrofotometría, o un método de extracción con cloroformo y posterior separación por cromatografía en capa fina y cuantificación por espectrofotometría,³⁰ por otro lado se citan dos métodos analíticos por CG para tabletas combinadas ^{31,32}. Más recientemente se han tenido métodos oficiales tales como el de filtración y limpieza de la muestra con ayuda de un equipo automatizado acoplado a dos detectores uno espectrofotométrico y un detector fluorométrico para la noretindrona y el mestranol respectivamente,¹⁸ separación y cuantificación por cromatografía de líquidos en fase reversa utilizando un detector espectrofotométrico ^{7,27}.

B. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR MESTRANOL Y NORETINDRONA POR C.G.L. EN TABLETAS COMBINADAS

Por necesidad y conveniencia del laboratorio se requería del desarrollo de un método para identificar y cuantificar noretindrona y mestranol en una formulación de tabletas, por un método de cromatografía de gases.

Basándose en las propiedades fisicoquímicas de ambos activos y su comportamiento cromatográfico como esteroide; se empezó a probar este comportamiento con una mezcla de soluciones estándar disueltas en cloroformo. Por otro lado y a la par con estas pruebas, se buscaron entre las sustancias disponibles algunas que pudieran en un momento dado ser utilizadas como estándar interno para este método. Las columnas probadas en esta primera etapa fueron XE-60 al 3 y 5 % y UC-W98 al 3 % sobre cromosorb W-HP.

Los resultados a los que se llegaron fueron los siguientes:

1. Las columnas XE-60 al 5 y 3 %, y en particular esta última resultó ser la columna que mejor resolución tenía para ambos activos.
2. La progesterona fue la sustancia con mejor comportamiento cromatográfico para utilizarse como estándar interno.
3. La columna UC-W98 al 3 %, no resolvía para ambos esteroides.

Posteriormente con estos resultados y con la preparación de la mezcla de estándar (mestranol, 100 mcg/ml + noretindrona 2 mg/ml + progesterona 1.2 mg/ml correspondiente al 100 %), se buscó con la columna XE-60 al 3 % las condiciones cromatográficas más adecuadas para la cuantificación e identificación. En conjunto con estas pruebas, se empezó a diseñar el método de extracción para la muestra y realizar ensayos para la especificidad ante excipientes. Los resultados de estas pruebas indican que la resolución entre los tres esteroides del estándar es bastante satisfactoria.

Con lo anterior la columna de elección resultaba ser la XE-60 al 3 %, sin embargo, presentó el inconveniente de que se desangraba en cada inyección; el síntoma de lo anterior se presento cuando en cada inyección la línea base se perdía y no respetaba la línea marcada como cero. Por otro lado las pruebas realizadas sobre los placebos resultaron satisfactorias en cuanto a la especificidad ante excipientes.

Posteriormente se encontro después de realizar algunas pruebas e investigaciones que la causa del desangrado de la columna era en parte por su baja estabilidad térmica de este tipo de fase y además por efecto del cloroformo utilizado

como disolvente de las muestras; con lo cual se opto por probar otros solventes en el que fueran disueltos los

activos. Finalmente el cambio no fue muy satisfactorio puesto que de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de las sustancias de interés los solventes con mayor probabilidad serian el metanol y el dioxano los que al final presentaron problemas de coleo y por ende podrian en un momento dado interferir en la cuantificación, por lo que se opto el cambiar de columna.

Asi se preparo y probo una columna con fase estacionaria QF-1 al 3 %; sobre la cual se realizaron todas las pruebas preliminares que se ensayaron en la columna XE-60, llegando a las siguientes conclusiones:

1. El uso de la progesterona como estándar interno se descarto puesto que en esta columna se retenia demasiado.
2. De la serie de estándares probados, el acetato de testosterona resulto ser el de mejores características cromatográficas para usarlo como estándar interno.
3. Los placebos no presentan señal alguna a los tiempos de retención, de las sustancias de interés.

Una vez obtenidos estos resultados, se procedio a realizar los siguientes ensayos:

1. Buscar y perfeccionar las condiciones de trabajo en cuanto a equipo, material y método para la cuantificación de la noretindrona y mestranol.
2. Probar la repetibilidad del sistema con inyecciones sucesivas del estándar al 100 %, calculado por areas y alturas.
3. Experimentar y planear el método de extracción más apropiado para trabajar con las muestras.

Por último los resultados de esta parte final del desarrollo fueron completamente satisfactorios por lo que se planteo y propuso el método a validar como el que a continuación se describe:

METODO ANALITICO PROPUESTO PARA CUANTIFICAR NORETINDRONA Y MESTRANOL POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO EN TABLETAS

RESUMEN

Dispersión de la muestra en agua destilada, extracción de los esteroides con cloroformo y su posterior cuantificación por cromatografía de gas líquido, utilizando acetato de testosterona como estándar interno.

EQUIPO Y REACTIVOS

1. Agitador mecánico Super-Mixer, Lab. Line instruments.
2. Centrifuga IEC modelo K, Inter. Equip. Co..
3. Balanza analítica Sartorius modelo 1712.
4. Baño de vapor.
5. Mestranol, estándar de referencia.
6. Noretindrona, estándar de referencia.
7. Acetato de Testosterona, estándar interno.
8. Cloroformo R.A. Merck.

SISTEMA CROMATOGRAFICO

Instrumento

Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard Mod. 5890 equipado con detector de ionización de flama.

Automuestreador Hewlett-Packard Mod. 7673-A.

Integrador Hewlett-Packard Mod. 3396-A.

Columna de vidrio (3 ft. x 0.2 cm di.) empacada con la fase QF-1 al 3%, sobre chromosorb W-HP malla 100/120.

Condiciones Cromatográficas:

Temperatura del horno:	210°C
Temperatura del Inyector:	240°C
Temperatura del Detector:	240°C

Flujo:

Nitrógeno	55 mL/min. (acarreador)
Aire	450 mL/min.
Hidrógeno	43 mL/min.
volumen de inyección:	1 mL
Sensibilidad:	Inicial 8.0 mV y 64 mV al tiempo aprox. de 5.0 min.
Velocidad de carta:	0.1 cm/min.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR

Solución de estándar interno.

Pesar con exactitud aproximadamente 100 mg de acetato de Testosterona, estándar interno. Transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y llevar a volumen con cloroformo R.A.

Solución concentrada de mestranol.

Pesar con exactitud y por separado 10, 12.5 y 15 mg de mestranol, estándar de referencia, y transferirlos cuantitativamente a matraces volumétricos de 25 mL respectivamente. Disolver y llevar a volumen con cloroformo R.A.

Soluciones estándar de calibración.

Pesar con exactitud y por separado 8, 10 y 12 mg de noretindrona, estándar de referencia, dentro de tubos de ensayo (1.5 x 15 cm) con tapa de baquelita.

Adicionar a cada tubo 1 mL de la solución concentrada de mestranol, 3 mL de la solución de estándar interno y 1 mL de cloroformo R.A.

Agitar vigorosamente para homogeneizar en el Super-Mixer. Estas soluciones corresponden al 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada de mestranol y noretindrona respectivamente (100 mcg/ml de mestranol + 2 mg de noretindrona + 1.2 mg/ml de acetato de testosterona).

Inyectar en el sistema cromatográfico las soluciones estándar de calibración, bajo las condiciones antes enlistadas.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar 20 tabletas y calcular su peso promedio. Pulverizar las tabletas en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. Pesar con exactitud aproximadamente 800 mg de polvo, dentro de tubos de ensayo (1.5 x 15 cm) con tapa de baquelita. Adicionar 5 mL de agua destilada y calentar sobre un baño de vapor durante 15 minutos. Agitar vigorosamente en el Super-Mixer durante aprox. 1 minuto y dejar enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 3 mL de la solución de estándar interno y 2 mL de cloroformo R.A. Agitar vigorosamente en el Super-Mixer durante 1 minuto.

Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos. Filtrar la capa orgánica (inferior) a través de algodón.

Inyectar en el sistema cromatográfico las soluciones muestra bajo las condiciones antes enlistadas.

IDENTIFICACION

La identificación de mestranol y noretindrona es establecida por la comparación de los tiempos de retención obtenidos en el cromatograma de la solución estándar y en la solución muestra.

El orden de elución es el siguiente:

1. Mestranol $tr = 3.023$
2. Noretindrona $tr = 7.567$
3. Acetato de testosterona (estándar interno).
 $tr = 15.605$

CALCULOSDeterminar el contenido de mestranol por tableta.

Calcular el factor de respuesta para cada una de las soluciones estándar de calibración.

$$FR = \frac{AEI}{AST} \times \frac{PST}{25} \times \frac{1}{5}$$

Donde:

AEI = Area del estándar interno en la solución estándar
 AST = Area de mestranol en la solución estándar
 PST = Peso del estándar de referencia en mg

Calcular el factor de respuesta promedio (FRP) y la desviación estándar relativa (DER) de las 3 soluciones estándar de calibración.

Calcular el contenido de mestranol en la muestra:

$$\text{mcg/tableta} = \frac{\text{AMTA}}{\text{AEI}} \times \text{FRP} \times \frac{\text{PP}}{\text{PMTA}} \times 5 \times 1000$$

Donde:

AMTA = Área de mestranol en la muestra
 AEI = Área del estándar interno en la muestra
 PP = Peso promedio en mg
 PMTA = Peso de la muestra en mg

$$\% \text{ de mestranol} = \frac{\text{mcg/tableta encontrados}}{\text{mcg/tableta etiquetados}} \times 100$$

Determinar el contenido de noretindrona por tableta.

Calcular el factor de respuesta para cada una de las soluciones estándar de calibración.

$$\text{FR} = \frac{\text{AEI}}{\text{EST}} \times \frac{\text{PST}}{5}$$

Donde:

AEI = Área del estándar interno de la solución estándar
 AST = Área de la noretindrona en la solución estándar
 PST = Peso del estándar de referencia en mg

Calcular el factor de respuesta promedio (FRP) y la desviación estándar relativa (DER) de las 3 soluciones estándar de calibración.

Calcular el contenido de noretindrona en la muestra.

$$\text{mg/tableta} = \frac{\text{AMTA}}{\text{AEI}} \times \text{FRP} \times \frac{\text{PP}}{\text{PMTA}} \times 5$$

Donde:

AMTA = Area de la noretindrona en la muestra
AEI = Area del estándar interno en la muestra
PP = Peso promedio en mg
PMTA = Peso de la muestra en mg

$$\% \text{ de noretindrona} = \frac{\text{mg/tableta encontrados}}{\text{mg/tableta etiquetados}} \times 100$$

C. Validación del Método Analítico

LINEALIDAD

La linealidad del método fue determinada preparando doce soluciones de placebos cargados a seis diferentes concentraciones correspondientes al 70, 80, 90, 100, 110 y 120 % de noretindrona y mestranol etiquetado. Se determinó el coeficiente de correlación, el error estándar de regresión, la pendiente y el intercepto; así como sus límites de confianza al 95 %.(La linealidad del sistema se efectuó con soluciones de estándar)

EXACTITUD

Para determinar la exactitud del método se utilizaron las mismas soluciones preparadas para la linealidad. Preparadas por el mismo analista y bajo las mismas condiciones de operación. Se determinó para los % de recobro, la desviación estándar, y la media; así como, sus límites de confianza al 95%.

PRECISION

Reproducibilidad

La precisión del método fue realizada por 2 analistas en 2 días diferentes, utilizando un lote piloto preparado y almacenado exclusivamente para esta validación, mantenido a T. A por 15 días.. Se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentos de recobro de un total de 12 muestras. Los resultados finalmente se evaluaron por medio de un análisis de varianza siguiendo un modelo de dos factores aleatorios.

Repetibilidad

La repetibilidad del método se realizó analizando 10 soluciones de placebos cargados preparadas de manera independiente y a una concentración correspondiente al 100 % de noretindrona y mestranol etiquetado. Realizadas por un sólo analista, usando los mismos aparatos y técnicas. Se determino en coeficiente de variación, la desviación estándar y sus límites de confianza al 95%.

LIMITE DE CUANTIFICACION

Se determino preparando y analizando seis soluciones de placebos cargados a seis diferentes concentraciones correspondientes al 30, 25, 20, 15, 10 y 5 % de la cantidad etiquetada noretindrona y mestranol. Esta prueba se realizo variando la concentración de uno de los activos y manteniendo constante el otro al 100 % y viceversa.

ESPECIFICIDAD

Especificidad ante excipientes de la formulación (métodos de control)

Se determino la especificidad del método frente al los excipientes inactivos de la formulación bajo las mismas condiciones de operación propuestas en el método.

TOLERANCIA

Se determino la tolerancia que presenta el método variando el porcentaje de carga de fase estacionaria. Probando una columnas al 2 y al 4% de la fase QF-1.

IV. RESULTADOS

A. Validación Estadística

1. LINEALIDAD MESTRANOL

En la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos para la linealidad del mestranol. Se realizó la evaluación estadística de la pendiente y del intercepto. En la figura 10, observamos la representación gráfica de la respuesta lineal.

Las fórmulas utilizadas para el cálculo estadístico se encuentran en el anexo A.

tabla 5

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
0.00	0.00	0.00
8.79	9.06	103.07
8.79	8.97	102.05
10.09	10.30	102.08
10.11	10.16	100.49
11.28	11.50	101.95
11.34	11.39	100.44
12.52	12.70	101.44
12.56	12.63	100.56
13.75	13.61	98.98
13.75	13.60	98.91
14.98	15.11	100.86
15.04	14.86	98.80

PENDIENTE: 0.9904

INTERCEPTO: 0.1743

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.9993

Error Experimental:

$$E_{ij} = 0.1714$$

Ecuación del Sistema:

$$Y = 0.1743 + 0.9904 (X) + 0.1714$$

Error estándar de regresión:

$$S_{y/x} = 0.1518$$

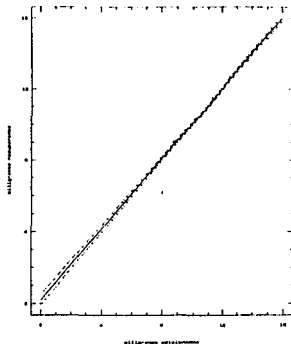


Figura 10. Representación gráfica de la respuesta lineal obtenida del metranol.

Evaluación de la Pendiente

Prueba de Hipótesis:

$$H_0 \quad B_0 = 1$$

$$H_a \quad B_0 \neq 1$$

Estadígrafo de Contraste: t de student

$$t \text{ cal.} = -0.03184$$

$$t(0.975, 11) = 2.2281$$

Area de Aceptación:

$$-2.2281 < -0.03184 < 2.2281$$

Intervalo de Confianza al 95 %

$$0.944172 < 0.9904 < 1.03663$$

Evaluación del Intercepto

Prueba de Hipótesis:

$$H_0 \quad A_0 = 0$$

$$H_a \quad A_0 \neq 0$$

Estadígrafo de Contraste: t de student

$$t \text{ cal.} = 0.6941$$

$$t (0.975, 10) = 2.2281$$

Area de Aceptación

$$-2.2281 < 0.6941 < 2.2281$$

Intervalo de Confianza al 95 %

$$- 0.38517 < 0.1743 < 0.73377$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

1. LINEALIDAD NORETINDRONA

En la tabla 6, se muestran los resultados obtenidos en la linealidad del la noretindrona. Se realizó la evaluación estadística de la pendiente y del intercepto. En la figura 11, observamos la representación gráfica de la respuesta lineal.

Las fórmulas para el cálculo estadístico se encuentran en el anexo A.

tabla 6

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
0.00	0.00	0.00
7.08	7.14	100.84
7.13	7.19	100.84
8.02	8.01	99.87
8.12	8.20	100.98
9.08	9.08	100.00
9.17	9.21	100.43
10.10	10.13	100.29
10.12	10.01	98.91
11.12	11.25	101.16
11.12	11.17	100.44
12.12	12.19	100.57
12.15	12.17	100.16

PENDIENTE: 1.003

INTERCEPTO: 0.006941

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.9998

Error Experimental:

$$E_{ij} = -0.0092$$

Ecuación del Sistema:

$$Y = 0.006941 + 1.003 (X) - 0.0092$$

Error estándar de regresión:

$$S_{y/x} = 0.0591$$

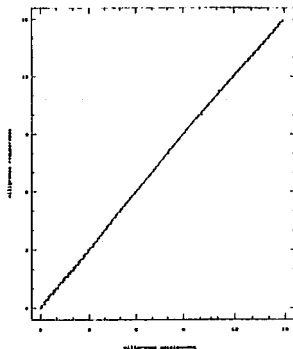


Figura 11. Representación gráfica de la respuesta lineal obtenida por la noretidrona.

Evaluación de la Pendiente**Prueba de Hipótesis:**

$$H_0 \quad B_0 = 1$$

$$H_a \quad B_0 \neq 1$$

Estadígrafo de Contraste : t de student

$$t \text{ cal.} = 0.009949$$

$$t (0.975, 11) = 2.2281$$

Area de Aceptación:

$$- 2.2281 < 0.009949 < 2.2281$$

Intervalo de Confianza:

$$0.98092 < 1.003 < 1.02507$$

Evaluación del Intercepto**Prueba de Hipótesis:**

$$H_0 \quad A_0 = 0$$

$$H_a \quad A_0 \neq 0$$

Estadígrafo de Contraste: t de student

$$t \text{ cal.} = 0.071755$$

$$t(0.975, 10) = 2.2281$$

Area de Aceptación:

$$- 2.2281 < 0.071755 < 2.2281$$

Intervalo de Confianza:

$$- 0.34583 < 0.006941 < 0.35971$$

2. EXACTITUD MESTRANOL

Para el cálculo de la exactitud se utilizaron los valores de porciento de recobro de la linealidad. (ver tabla 5). Las formulas utilizadas para la evaluación estadística se encuentran en el anexo B.

$$\begin{aligned}n &= 12 \\ \bar{X} &= 100.803 \% \\ S &= 1.3475 \\ \text{C.V.} &= 1.337 \%\end{aligned}$$

Prueba de hipótesis:

$$\begin{aligned}H_0 &\mu = 100 \% \\ H_a &\mu \neq 100 \%\end{aligned}$$

Estadígrafo de contraste t de student:

$$\begin{aligned}t \text{ cal} &= 2.0651 \\ t (0.975, 11) &= 2.2010\end{aligned}$$

Por lo tanto, el método se considera exacto para mestranol

Intervalo de confianza al 95 %:

$$99.946 < 100.803 < 101.659$$

2. EXACTITUD NORETINDRONA

Para el calculo de la exactitud se utilizaron los valores del porcentaje de recobro de la linealidad.(ver tabla 6). Las formulas utilizadas para la evaluación estadística se encuentran en el anexo B.

$$\begin{aligned}n &= 12 \\ \bar{X} &= 100.374 \% \\ S &= 0.6072 \\ C.V. &= 0.6049 \%\end{aligned}$$

Prueba de hipótesis:

$$\begin{aligned}H_0 &\mu = 100 \% \\ H_a &\mu \neq 100 \%\end{aligned}$$

Estadígrafo de contraste t student:

$$\begin{aligned}t \text{ cal} &= 2.1336 \\ t (0.975, 11) &= 2.2010\end{aligned}$$

Por lo tanto, el método se considerar exacto para noretindrona.

Intervalo de confianza al 95 %:

$$99.988 < 100.374 < 100.759$$

3. REPETIBILIDAD MESTRANOL

Los resultados de la prueba de repetibilidad para el mestranol se encuentran reportados en la tabla 7. Las fórmulas utilizadas para la evaluación estadística se encuentran en el anexo C.

tabla 7

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
12.69	12.63	99.53
12.57	12.49	99.36
12.62	12.51	99.13
12.53	12.40	98.96
12.58	12.39	98.49
12.57	12.65	100.64
12.45	12.35	99.20
12.59	12.54	99.60
12.46	12.43	99.76
12.54	12.61	100.56

$$\bar{X} = 99.523$$

$$S = 0.6712$$

$$\sigma = 0.6367$$

$$C.V. = 0.6744 \%$$

Prueba de hipótesis:

$$H_0 \quad \sigma^2 < 1.5 \%$$

$$H_a \quad \sigma^2 > 1.5 \%$$

Estadígrafo de contraste: χ^2

$$\chi^2 \text{ cal.} = 1.8020$$

$$\chi^2 (0.975, 9) = 19.023$$

Por lo tanto el método se considera preciso para el mestranol en cuanto a repetibilidad.

Intervalo de confianza al 95 %:

$$0.213142 < 0.636758 < 1.5017$$

3. REPETIBILIDAD NORETINDRONA

Los resultados de la prueba de repetibilidad para la noretindrona se encuentran reportados en la tabla 8. Las fórmulas utilizadas para la evaluación estadística se encuentran en el anexo C.

tabla 8

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
9.99	10.01	100.20
10.00	10.09	100.90
10.01	10.14	101.29
10.12	10.21	100.88
10.15	10.16	100.09
9.96	10.08	101.20
10.13	10.24	101.08
9.99	10.09	101.00
10.00	10.13	101.30
10.03	10.15	101.19

$$X = 100.913$$

$$S = 0.4312$$

$$\sigma = 0.4091$$

$$C.V. = 0.4273 \%$$

Prueba de hipótesis:

$$H_0 \quad \sigma^2 < 1.5 \%$$

$$H_a \quad \sigma^2 > 1.5 \%$$

Estadígrafo de contraste : χ^2

$$\chi^2 \text{ cal.} = 0.7437$$

$$\chi^2 (0.975, 9) = 19.023$$

Por lo tanto el método se considera preciso para la noretindrona en cuanto a repetibilidad.

Intervalo de confianza al 95 %:

$$0.08797 < 0.4091 < 0.6198$$

3. REPRODUCIBILIDAD MESTRANOL

El las tablas 9 y 10, se muestran los resultados obtenidos de la prueba de reproducibilidad del método para el mestranol así como el análisis de varianza. Las fórmulas utilizadas para el análisis de varianza se encuentran en el anexo D.

tabla 9

Aj

	<u>Analista 1</u>	<u>Analista 2</u>
	92.17	91.91
Día 1	92.22	91.25
	93.11	91.70
Di		
	93.00	90.73
Día 2	94.95	92.79
	92.71	91.61
	n = 6	n = 6
	X = 93.027 %	X = 91.665 %
	S = 1.019	S = 0.6894
	C.V. = 1.095 %	C.V. = 0.7520 %
	n = 12	
	X = 92.345 %	
	S = 1.093	
	C.V. = 1.183 %	

tabla 10

ANALISIS DE VARIANZA PARA MESTRANOL

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	F cal.	F teo.
DI	1	0.98041	0.98041	1.4092	161.4
A _j	1	5.5624	5.5624	7.9951	161.4
DA _{ij}	1	0.69573	0.69573	0.9647	5.32
E _{(i)jk}	8	5.8917	0.73646	---	---

Por lo tanto el método es preciso para mestranol en cuanto a reproducibilidad.

3. REPRODUCIBILIDAD NORETINDRONA

En las tablas 11 y 12, se muestran los resultados obtenidos de la prueba de reproducibilidad del método para noretindrona así como el análisis de varianza. Las fórmulas utilizadas para el análisis de varianza se encuentran en el anexo D.

tabla 11

Aj

	<u>Analista 1</u>	<u>Analista 2</u>
	98.75	98.49
Día 1	98.36	97.96
	99.04	97.88
Di		
	97.67	97.04
Día 2	98.37	97.97
	98.13	97.74
	n = 6	n = 6
	X = 98.386 %	X = 97.846 %
	S = 0.4774	S = 0.4701
	C.V. = 0.4852 %	C.V. = 0.4805 %
	n = 12	
	X = 98.116 %	
	S = 0.5325	
	C.V. = 0.5427 %	

tabla 12

ANALISIS DE VARIANZA PARA NORETINDRONA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	F col.	F teo.
D _i	1	1.05616	1.05616	79.4105	161.4
A _j	1	0.87483	0.87483	65.776	161.4
DA _{ij}	1	0.0133	0.0133	0.09055	5.32
$\epsilon_{(i)jk}$	8	1.1750	0.1469	---	---

Por lo tanto el método se considera preciso para noretindrona en cuanto a reproducibilidad.

4. LIMITE DE CUANTIFICACION

El límite de cuantificación encontrado en la intercepción de la pendiente con la línea del eje de la X (no existe ruido cromatográfico) con el límite inferior del intervalo de confianza al 95%, resulta ser para el mestranol de 0.8% y de la noretindrona de 1.5% del porciento etiquetado.

6. LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema abarco un rango de 80, 100 y 120% (100 mcg/ml= 100% de mestranol, 2 mg/ml= 100% de noretindrona); obteniedose un C.V. de 0.40% para el mestranol y C.V. de 0.66% para la noretindrona.

5. SENSITIVIDAD

La sensibilidad esta definida como la pendiente de la curva de calibración, expresado como la relación del cambio de respuesta con el cambio de la concentración del la sustancia se interes. La sensibilidad para el mestranol es de 1.0057 y para la noretindrona 1.0037.

7. ESPECIFICIDAD DEL METODO

ANTE EXCIPIENTES INTACTOS

El método analítico muestra ser específico para ambos activos, ya que no presentan ningún pico a los tiempos de retención que tienen las sustancias de interés.

8. TOLERANCIA

La tolerancia para el método analítico se realizó probando los porcentos de carga de la fase estacionaria en una columna de vidrio de 3 ft y 2 mm di.

La columna utilizada para el método original es QF-1 al 3%, y algunos de sus parámetros de evaluación son:

Platos Teóricos

N1 = 309.76

N2 = 324.0

N3 = 567.17

Factor de Capacidad

K1 = 20.69

k2 = 52.87

K3 = 108.01

Resolución

R1 = 5.4787

R2 = 3.9070

R3 = 7.4296

Para la columna QF-1 al 2%, los parámetros de evaluación son:

Platos Teóricos

N1 = 177.27

N2 = 259.67

N3 = 357.84

Factor de Capacidad

K1 = 13.12

K2 = 33.18

K3 = 67.78

Resolución

R1 = 4.9580

R2 = 4.2765

R3 = 5.050

Se puede plantear como método alternativo para la cuantificación de noretindrona y mestranol modificando de preferencia el flujo del gas acarreador para obtener únicamente los tiempos de retención semejantes a los tiempos en el método original. Por otro lado las condiciones de temperatura se mantienen constantes.

Para la columna QF-1 al 4%, los parámetros de evaluación son:

Platos Teóricos

N1 = 283.58

N2 = 450.28

N3 = 547.81

Factor de Capacidad

K1 = 24.06

K2 = 62.15

K3 = 127.87

Resolución

R1 = 6.9720

R2 = 5.5123

R3 = 10.9993

Se puede plantear como método alternativo para la cuantificación de noretindrona y mestranol variando de preferencia la temperatura del horno, es decir trabajar a una temperatura de aprox. 215 °C. Por otro lado las condiciones de flujo del gas acarreador se mantienen iguales que en el método original.

ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados que se obtuvieron en cuanto al desarrollo del método fueron bastante buenos ya que se logro diseñar un método analítico con muchas ventajas tanto practicas como técnicas . Así tenemos un método capaz de lograr combinar la cuantificación de ambos activos, en un mismo proceso de extracción y separación con un procedimiento de preparación de la muestra sencilla y rápida ayudandose de un estándar interno y ademas se obtienen en una misma corrida cromatografica. Lo anterior se logro en cierta forma a las propiedades de solubilidad de los activos y al comportamiento cromatografico que presentan los esteroides en la columna.

En cuanto a la validación resulto ser un método lineal, exacto, preciso para ambos activos. Más sin embargo durante el proceso de validación se encontraron contratiempos; tales como falta aparente de reproducibilidad y exactitud causados principalmente por la gran diferencia de concentraciones de ambos activos en la formulación.

En lo que respecta a la especificidad del método, se encontro que resulta ser especifico para utilizarse en pruebas de rutina puesto que los cromatogramas del placebo y del placebo + estándar interno no presentan ninguna señal a los mismos tiempos de retención que presentan las sustancias de interes.

Por último, es importante mencionar que este método puede tener métodos alternos, utilizando otras columnas con un porcentaje de carga de fase estacionaria diferente; y únicamente realizando los cambios pertinentes (velocidad de

flujo del gas acarreador o temperatura del horno), para lograr un método de cuantificación de estos esteroides.

CONCLUSION

El método analítico resulto se lineal, exacto, preciso y específico para utilizarse en pruebas de rutina (control de calidad), para ambos activos.

EVALUACION DE LA PENDIENTE:

Prueba de Hipótesis: Ho b = B
 Ha b ≠ B

donde B = 1

Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ cal.} = \frac{(b-B) (\hat{S}_{y/x}) \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

Decisión estadística:

Si $t \text{ cal.} \leq t (0.975, n-2 \text{ gl})$
y $t \text{ cal.} \geq t (0.025, n-2 \text{ gl})$

Puede considerarse que estadísticamente $b = 1$

Intervalo de confianza al 95%:

$$b \pm t_{\alpha/2} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

Si ambas hipótesis, tanto para a como para b son aceptadas, el método se considera como lineal.

ANEXO C.

FORMULAS PARA EVALUAR LA EXACTITUD DE UN METODO ANALITICO

Prueba de Hipótesis: Ho $\mu = 100\%$
 Ha $\mu \neq 100\%$

Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ cal.} = \frac{\bar{x} \% - \mu}{s_x / \sqrt{n}}$$

Decisión estadística:

Si $t \text{ cal.} < t (0.975, n-1 \text{ gl})$
y $t \text{ cal.} > t (0.025, n-1 \text{ gl})$

El método se considera exacto.

Intervalo de confianza al 95%:

$$\bar{x} \% \pm t_{1-\alpha/2} \cdot s / \sqrt{n}$$

ANEXO D.

FORMULAS PARA EVALUAR LA REPRODUCIBILIDAD DE UN METODO ANALITICO.

Modelo matemático (2 factores aleatorios).

$$Y_{ij} = D_i + A_j + AD_{ij} + E_{(ij)k}$$

donde:

Y_{ijk} = porcentaje cuantificado por el i-ésimo analista en el j-ésimo día en la k-ésima repetición.

D_i = efecto de i-ésimo día sobre el porcentaje cuantificado.

A_j = efecto de j-ésimo analista sobre el porcentaje cuantificado.

AD_{ij} = efecto a la interacción analista-día.

$E_{(ij)k}$ = error experimental.

INFERENCIAS:

a. Efecto por el día (D).

Si $F_{cal D} < F(0.95)$ con $gl D/gl AD$

No existe efecto por el día.

b. Efecto por analista (A).

Si $F_{\text{cal A}} < F(0.95)$ con gl A/gl AD

No existe efecto por analista.

c. Efecto por la interacción analista-día (AD).

Si $F_{\text{cal AD}} < F(0.95)$ con gl AD/gl error

No existe efecto por la interacción analista-día.

Los tres criterios anteriores deben cumplirse para poder asegurar que un método analítico es reproducible.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS		MEIA DE CUADRADOS	F cal.
Di	i-1	$\sum y_i^2$	y^2	SC dfa	MC dfa
		jk	ijk	i-1	MC ana-dfa
A _j	j-1	$\sum y_j^2$	y^2	SC ana	MC ana
		ik	ijk	j-1	MC ana-dfa
AD _{ij}	(i-1)(j-1)	$\sum \sum y^2_{ij}$	$\sum \sum y_i^2$	SC ana-dfa	MC ana-dfa
		k	ik jk	ijk	(i-1)(j-1)
error exp.	ij(k-1)	$\sum \sum \sum y^2_{ijk}$	$\sum \sum y^2_{ij}$	SC error	
			k	ij(k-1)	

BIBLIOGRAFIA

1. Hurad, F. y Haynes, R. C., HORMONAS Y ANTAGONISTAS, CAP. xV, Goodman and Gilman ,Bases Farmacologicas de la Terapéutica, ed. 7*, Editorial Interamericana, Buenos Aires, Argentina, 1987.
2. Eik-Nes K. B. and Horning E. C., GAS PHASE CHOMATOGRAPHY OF STEROIDS, Monographs on Endocrinology, vol 2, ed. by A. Labhart, Germany 1968.
3. Mc Nair M. H. CROMATOGRAFIA DE GASES, Monografía No. 23, Secretaría general de la organización de los Estados Americanos, Washington D.C., 1981.
4. Rowland F. W., LA PRACTICA DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES, División de Avondale Hewlett-Packard, 1977.
5. Guerra J., Finkelson M. J., "Validation of Analitical methods by FDA laboratoies" Pharm. techn., marzo 1986, 79-84
6. Aguilar G., Alcantara A., García A., y col., REQUISITOS MINIMOS PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos biólogos, A. C.
7. The United States Pharmacopeia, XXII ed. and National Formulary XVII th. ed., United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A. 1990.
8. Windholz, M. et al, The Merck Index 10*, ed. Merck Co., U.S.A. 1983.

9. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5^a ed., Secretaría de Salud, México 1988.

10. British Pharmacopoeia, vol. I, General Medical Council by The Pharmaceutical Press, London, 1988.

11. Physical-Chemical data, PDC file 5, NORETHINDRONE, Syntex Research, Palo Alto California, 1980.

12. Physical-Chemical data, PDC file 6, MESTRANOL, Syntex Research, Palo Alto California, 1980.

13. Rodriguez C. R., VADEMECUM ACADEMICO DE MEDICAMENTOS, TOMO II, UNAM, MEXICO 1984.

14 Manufacturing/Quality Assurance (M/QA) file 35, NORETHINDRONE 1.0 mg TABLET WITH MESTRANOL 50 mcg., Syntex Research, Palo Alto California, 1981.

15. The National formulary NF XIII, (thirteenth Edition) 1970, Published by American Pharmaceutical Ass. Washington D. C.

16. The United States Pharmacopeia, XVIII ed, United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A. 1970.

17. The United States Pharmacopeia, XIX ed. and National Formulary XV Th. ed. , United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A. 1975.

18. The United States Pharmacopeia, XX ed. and National Formulary XIV th. ed., United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A. 1980.

19. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4^a ed., Secretaría de Salubridad y Asistencia, México 1974.
20. Farmacos 1973, Camara Nacional de la Industria de laboratorios químicos-Farmaceuticos, México 1973.
21. British Pharmacopoeia, vol. I, General Medical Council by The Pharmaceutical Press, London, 1968.
22. Galloway K., Método 48A, NORINYL TABLET, Syntex, Palo Alto, California, 1965.
23. Shah G., Método 48B, NORINYL TABLET AND GRANULATION, Syntex, Palo Alto, California, 1969.
24. Ferguson T., Método 105, NORINYL TABLET, Syntex, Palo Alto, California, 1964.
25. Horwitz W., Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Twelfth ed., U.S.A. 1975.
26. Ferguson T., Método 118, NORINYL TABLET, Syntex, Palo Alto, California, 1964.
27. Crugman B., Método 319, NORINYL-I, Syntex, Palo Alto, California, 1968.
28. Brunner, C. A., COLLABORATIVE STUDY OF ANALYSIS OF MESTRANOL IN COMBINATION WITH NORETHINDRONE OR NORETHYNODREL, J. Ass. Offic. Anal. Chem. 53 (2), 234-7, 1970.

29. Correia S. J., Celso C. A., MESTRANOL + NORETHISTERONE ANALYTIC CONTROL OF TABLETS, Bol. Fac. Farma. Univ. Coimbra, Ed. Cient 28, 53-9, Port. 1968.

30. Brunner, C. A. and Kunze F. M., ANALYSIS OF MESTRANOL IN COMBINATION WITH NORETHINDRONE OR NORETHYNODREL BY PARTITION CHOMATOGRAPHY AND UV MEASUREMENT, J. ASS. OFFIC. ANAL. CHEM. 53 (2), 234-7, 1970.

31. Milner D., Goodhue V., Método 326B, NORETHINDRONE + MESTRANOL COMBINATION TABLETS, Syntex, Palo Alto, California, 1969.

32. Crugman B., Método F-1923, DETERMINACION DE NORETINDRONA Y MESTRANOL POR CROMATOGRAFIA DE GASES, Syntex DIFA, México, 1983.

33. Daniel W. W., BIOESTADISTICA, ed. Limusa, México 1984.