33
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "ZARAGOZA"

"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR SENOSIDOS A-B EN MATERIA PRIMA POR ESPECTROFOTOMETRIA"

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 :

MARIA REYNA MELGAR MORENO

México, D. F. 1992

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

I N D I C E

	Página
INTRODUCCIÓN	1
I.- FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	2
A. GENERALIDADES	2
1. Validación	2
2. Criterios estadísticos para validar un método	3
a. Especificidad	5
b. Linealidad	6
c. Exactitud	7
d. Precisión	8
1) Repetibilidad	9
2) Reproducibilidad	9
e. Sensibilidad	10
B. MONOGRAFÍA	11
1. Senósidos A/B	11
a. Sinónimos	11
b. Fórmula Desarrollada	11
c. Fórmula Condensada	11
d. Peso Molecular	11
e. Empaque y Almacenamiento	12
f. Descripción	12
g. Contenido	12
h. Solubilidad	12
i. Punto de fusión	12
j. Usos terapéuticos	12
k. Identificación	13
C. ESPECTROFOTOMETRÍA	15
1. Teoría elemental	16
2. Interacciones entre materia y energía	17
3. Ley fundamental de la espectrofotometría	17
4. Desviaciones de la ley de la espectrofotometría	18
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
III.- OBJETIVO	21

IV.-HIPOTESIS 22
V.- PARTE EXPERIMENTAL 23
A. MATERIAL Y EQUIPO 23
1. Material 23
2. Sustancias 23
3. Equipo 23
B. PROCEDIMIENTO 24
1. Preparación del reactivo 24
2. Preparación de la muestra 24
VI.- RESULTADOS 25
A. ESPECIFICIDAD 25
B. PRECISIÓN (Repetibilidad) 26
C. EXACTITUD 28
D. LINEALIDAD 30
E. REPRODUCIBILIDAD 35
F. SENSIBILIDAD 37
VII.- ANALISIS DE RESULTADOS 39
VIII.- CONCLUSIÓN 41
ANEXO I FÓRMULAS 42
ANEXO II 48
A. CALIFICACIÓN Y CALIBRACIÓN DE LA BALANZA ANALÍTICA 48
B. CALIFICACIÓN Y CALIBRACIÓN DEL ESPECTOFOTÓMETRO 50
C. LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA 52
IX.- BIBLIOGRAFIA 54

INTRODUCCION

La industria Químico-Farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados. Además de ser una de las regulaciones que el estado establece como obligatoria que debe ser certificada y auditada regularmente. (6,7)

Las hojas de senósidos A/B son un fármaco laxante que se administra por vía oral en la forma farmacéutica tableta. Para su ensayo se han utilizado diversos metodos, algunos de bajo costo sin embargo no son específicos, otros de alta sensibilidad, exactitud y reproducibilidad, pero de alto costo por el equipo y reactivos utilizados. Por ello Representaciones Mex-América S.A., desarrolló y validó un método espectrofotométrico directo en el que se disuelve la muestra en un reactivo de bicarbonato de sodio-metanol que posteriormente se diluye con el mismo reactivo para su medida de absorbancia a 263 nm. El método se caracteriza por su simplicidad, sensibilidad, exactitud, precisión y bajo costo; lo cual lo hace util tanto para el ensayo de materia prima como de contenido de principio activo en tabletas. (1,12,25)

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. GENERALIDADES

1. Validación. La validación de un método analítico es un proceso por el cual se demuestra que un procedimiento proporciona resultados dentro de tolerancias aceptables para lo cual fue diseñado, además de que permite conocer el comportamiento de un proceso bajo diferentes condiciones de operación, y posteriormente utilizarlo para procesos rutinarios. (7,15)

Un método analítico validado es aquel para el cual la exactitud es conocida y la variabilidad del método ha sido establecida. Esto significa que las desviaciones del método y las posibles interferencias han sido identificadas, la especifidad es conocida, la precisión está establecida y la sensibilidad (límite de detección) o la capacidad para detectar cambios relativos es adecuada. (7)

2. Criterios estadisticos para Validar un Método.

La Estadistica herramienta de la calidad reúne datos, los analiza e interpreta para inferir consecuencias y sacar conclusiones validas a partir de estos elementos. (20)

La forma de validar un método analitico depende de su futura aplicación, esto es, segun el área de control en que va a ser utilizado, por ejemplo, en pruebas de estabilidad, en análisis rutinario, etc... (7) ver tabla (1). Sin embargo todos los métodos deben cumplir con los siguientes parámetros:

PARAMETRO	CONTROL DE CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD		BIODISPONIBILIDAD	REVALIDACIÓN DEL METODO	
		BAJAS CONCENTRACIONES	ALTAS CONCENTRACIONES		SIN CAMBIO EN COND. DE OPERACIÓN	CON CAMBIO EN COND. DE OPERACIÓN
LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA	X	X	X	X	X	X
LIMITE DE DETECCIÓN		X		X		
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN		X		X		
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%	X	X	X	X	X	X
LINEALIDAD DEL METODO	X	X	X	X	X	X
PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)	X	X	X	X		X
ESPECIFICIDAD (CONTROL DE CALIDAD)	X	X	X	X	X	X
ESPECIFICIDAD (ESTABILIDAD)		X	X			
TOLERANCIA DEL SISTEMA		X	X	X		X
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	X	X	X	X		

TABLA I. Parametros a evaluar dependiendo de la aplicación del método.

a. Especificidad: El procedimiento no solamente debe distinguir las moléculas del farmaco dentro de varias moléculas, sino también algunas veces debe distinguir las moléculas de un fármaco de otros fármacos. Idealmente el fármaco medido debe estar libre de interferencias por todos los materiales conocidos, en particular, que los excipientes no interfieran con la medida de la potencia del principio activo. (25,31)

La especificidad es la habilidad de un metodo analitico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la forma farmacéutica. (7,15)

CRITERIO:

Muestra	Respuesta
Placebo..... (todos los excipientes de la forma farmacéutica sin principio activo)	No da respuesta (menor del 2%)
Estándar.....	Da respuesta (100%)
Placebo cargado..... (excipientes + una cantidad del principio activo igual al estándar	Da respuesta igual al estándar (100%)

b. Linealidad. La linealidad de un método analitico es la habilidad de este para asegurar que los resultados experimentales, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matematica bien definida, son proporcionales a la concentración de fármaco dentro de un rango determinado. La linealidad de un método analitico mide el grado en que la respuesta del método, al trabajar a diferentes concentraciones se aproxime a una funcion lineal del tipo:

$$y = bx + a.$$

Se determina con placebos cargados, cada uno de manera independiente, utilizando cuando menos tres diferentes niveles de concentración que incluyen el 100%, este análisis se realiza por triplicado para cada concentración. El estudio deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación. (7,25,31)

CRITERIO:

b = pendiente = 1 = tan 45°
a = ordenada al origen = 0
r = coeficiente de correlación ≥ 0.99
r^2 = coeficiente de determinacion ≥ 0.98
CV = coeficiente de variación ≤ 3 % *
PR = por ciento de recobro 97-103% *
* Ver tabla II

MÉTODO:	PROMEDIO DE RECOBRO	CV
Cromatográficos	98 - 102%	≤ 2%
Titrimétricos	98 - 102%	≤ 2%
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103%	≤ 3%
Microbiológicos	95 - 105%	≤ 5%

TABLA II. Promedio de recobro y coeficiente de variacion

c. Exactitud. El método debe revelar dentro de un límite aceptable la cantidad de fármaco que está presente en la forma farmacéutica. Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. (7)

La exactitud se expresa como el porciento de recobro obtenido de el análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia. Se evalua utilizando placebos cargados, se maneja en porcientos de recobro. (7,15,25,31)

CRITERIO:

El estadígrafo de contraste utilizado es t de student

Área de aceptación para Ho

$$t_{\alpha/2} < t_{cal} < t_{1-\alpha/2}$$

El intervalo de confianza para la media, debe incluir el 100%

Intervalo de confianza

$$\bar{X} + (t_{\alpha/2} * S/\sqrt{n}) < \bar{X} < \bar{X} + (t_{1-\alpha/2} * S/\sqrt{n})$$

El CV debe cumplir con los criterios establecidos en la linealidad del método CV ≤ 3% (7)

d. Precisión. Es la variación de los resultados obtenidos entre mediciones repetidas de la misma cantidad. Usualmente se expresa en términos de desviación o del coeficiente de variación. Es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método, bajo las condiciones normales de operación. (7,25,31)

1). Repetibilidad. Es la precisión del método analítico expresado como la variación entre los resultados obtenidos en determinaciones independientes realizadas por un solo analista, bajo las mismas condiciones de operación (tiempo, aparato, laboratorio, etc). (7,25,31)

Se lleva a cabo mediante la evaluación de la varianza muestral, y requiere de la desviación estándar del porciento de recobro.

CRITERIO:

Estadígrafo de contraste $X^2_{cal} < X^2_{1-\alpha/1}$

Intervalo de confianza

$$\sqrt{\frac{(n-1)S^2}{X^2_{1-\alpha/2}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)S^2}{X^2_{\alpha/2}}}$$

$$CV \leq 3\ \%$$

2.) Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (analista, día, en el mismo y/o en diferentes laboratorios) utilizando el mismo y/o diferente equipo. (7)

Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos dias diferentes y por triplicado cada muestra. Se debe trabajar de manera independiente partiendo de una muestra del producto al 100% de la concentración teórica. La reproducibilidad se maneja en porciento de recobro. (15,25,31)

CRITERIO:

El estadigrafo de contraste es F de Fisher. (22)

Se evalua utilizando la tabla de análisis de varianza (ANADEVA) que mide los efectos de los factores analista y dia.

Modelo Matemático

$$Y = \mu + Ai + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

e. Sensibilidad. La sensibilidad es la minima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. (7,15,31)

Experimentalmente se evalua disminuyendo la cantidad de sustancia a una concentracion de 50% del nivel establecido que detecta el metodo y se va disminuyendo de 10 en 10% hasta que el metodo da señal de ruido. (7)

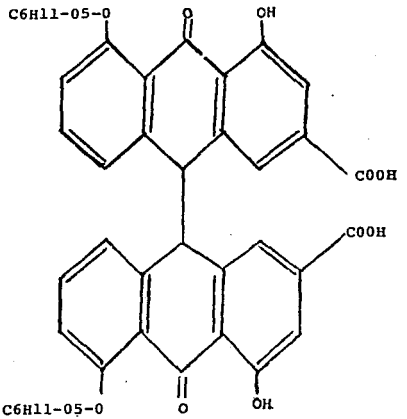
f. Adicionalmente se requiere que el método analitico sea práctico, sencillo y económico.

B. MONOGRAFIA

1. Senósidos A/B.

a. Sinónimos. Amyron, Colonorm, Glysennid, Laxenna, Nytilax, Pursennid.

b. Fórmula Desarrollada.



c. Fórmula Condensada. $C_{42}H_{38}O_{20}$

d. Peso Molecular. 862.72 g/mol

e. Empaque y almacenamiento. En envases hermeticos protegidos de la luz.

f. Descripción. Polvo de color amarillo verdoso con ligero olor al fruto del sén.

g. Contenido. No menos del 90% y no mas del 110% de la cantidad especificada en el marbete de senósidos A/B.

h. Solubilidad. Insoluble en agua, benceno, éter y dioxano. La solubilidad aumenta tremendamente en solventes orgánicos miscibles con agua en un 30% p/p. Soluble en soluciones acuosas de bicarbonato de sodio. El senósido A puede ser ligeramente isomerizado a B en solucion de bicarbonato de sodio a 80° C. El senósido B es mas soluble que el senósido A.

i. Punto de Fusión. Senósido A: 200-240°C
Senósido B: 180-186°C

j. Usos Terapeuticos. Catártico, laxante.

k. Identificación.

1). A 25 mg de senósidos con 5 ml de agua y 2 ml de acido clorhidrico, se calientan en baño maria; se enfrian y se adiciona 4 ml de éter, se mezclan, se dejan separar las fases y la fase etérea se seca con sulfato de sodio anhidro, se llevan 5 ml de la capa etérea a sequedad, se enfrian y se adicionan 5 ml de solución diluida de amonio; se produce un color amarillo-naranja que al calentarlos durante dos minutos en baño maria cambia a rojo-violeta.

2). Espectro de absorción.

Marca: Espectrofotómetro Perkin Elmer

Modelo: Lambda 2 uv/vis

Método: 2

Rango: λ_{max} = 380 nm λ_{min} = 190nm

Velocidad del papel: 120 nm/min

Lámpara: uv

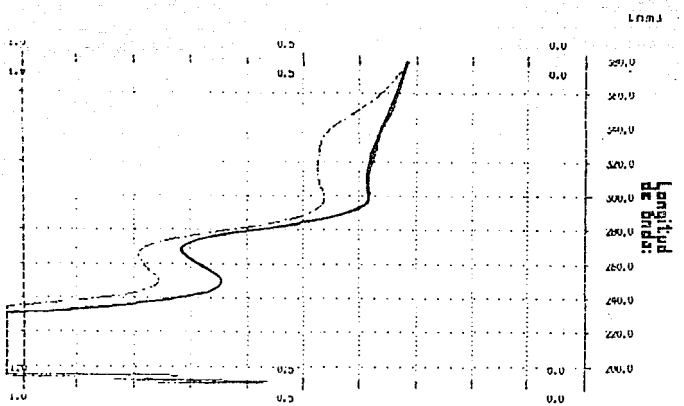
Escala: 20 nm/cm

Blanco: Solución de bicarbonato de sodio-metanol

Patrón de comparación: Estándar secundario de senosidos A/B, potencia = 4.072 %

Muestra: Senósidos A/B

ABSORBANCIA



	MUESTRA	TIEMPO	LONGITUD DE ONDA	ABSORBANCIA
——	Estándar secundario de senósidos A/B.	14 seg	199.2 nm (máx) 191.2 nm (min)	2.051 0.561
----	Senósidos A/B	18 seg	201.6 nm (máx) 191.4 nm (min)	2.633 0.617

C. ESPECTROFOTOMETRIA

Uno de los métodos fisicoquimicos más empleados en análisis es el de la medida de absorción o emisión de la energia radiante. La gran difusión de esta técnica es consecuencia de los factores siguientes: (1) el amplio intervalo de longitudes de onda o de frecuencias de energia radiante y sus diferentes modos de interacción con la materia; (2) la existencia en el mercado de instrumentos de medida cada vez más precisos; (3) las ventajas inherentes al método. Generalmente, el análisis es muy rápido, una vez que se ha establecido el método, a no ser que se requiera un tratamiento previo para eliminar interferencias. El método es, por tanto, muy cómodo para medidas repetidas de un mismo constituyente, como sucede en la rutina del análisis de control. Además, el método es, en general, aplicable a la determinación exacta de cantidades de constituyentes mucho menores que con los métodos graviméticos o volumétricos. Con frecuencia es un método no destructivo de la muestra, lo que puede ser importante cuando el constituyente es muy valioso, como sucede en los programas de investigación con ciertas sustancias bioquimicas o elementos transuránidos. Los metodos espectrofotométricos tienen tal importancia, que son los más utilizados en casi todos los laboratorios industriales, clinicos, de investigación o de enseñanza. (11,12)

1.TEORIA ELEMENTAL:

La energia radiante puede ser, emitida por sustancias bajo condiciones de gran excitacion como las producidas por altas temperaturas o por descargas electricas. Esta energia puede ser absorbida, transmitida, reflejada, y refractada por muchas sustancias en diferentes estados de agregación (solido, liquido, gas) si la radiacion incidente tiene una longitud de onda apropiada. Es energia, porque exhibe propiedades caracteristicas de otras formas de energia y puede de hecho ser convertida en otras fuentes de energia, como calor y electricidad. No es continua, sino que consiste en pequeños paquetes de energia, llamados fotones o cuantos que se propagan en movimiento ondulatorio. Las ondas por las cuales es transportada la energia radiante consisten en desplazamientos eléctricos y magnéticos pulsantes que ocurren en ángulo recto con la dirección de propagación. (11,12)

2. INTERACCIONES ENTRE MATERIA Y ENERGIA:

Las formas de interacción más importantes entre la materia y la energia son los fenómenos de emisión y absorción, el primero se obtiene analizando la luz emitida por una fuente luminosa, mientras que el espectro de absorción se obtiene analizando espectroscopicamente la luz transmitida por un medio absorbente colocado entre la fuente de luz y el espectroscopio.

Cuando una molécula absorbe radiación, su energía aumenta en una cantidad igual a la cedida por el fotón, como se expresa en la relación:

$$E = h\nu$$

E = ENERGIA DE UN CUANTO

h = CONSTANTE DE PLANCK $6.55 * 10^{-27}$

ν = FRECUENCIA

La absorción de radiaciones de las zonas ultravioleta y visible del espectro afecta a los electrones de la capa externa (de valencia) de los átomos, de aquí que dependa del estado de combinación de los átomos. (11,12)

3.- LEY FUNDAMENTAL DE LA ESPECTROFOTOMETRIA:

El poder de emisión radiante disminuye en relación a la distancia recorrida a través de un medio absorbente. También disminuye en relación a la concentración de moléculas absorbentes o de iones encontrados en ese medio.

$$A = abc$$

A = absorbancia

a = constante de extinción molar

b = distancia recorrida

c = concentración

4.- DESVIACIONES DE LA LEY DE ESPECTROFOTOMETRÍA:

1) Carencia de monocromatismo de la luz incidente.

2) Cambios de concentración del soluto por disociacion, asociación, ionización, fluorescencia, efecto de pH, etc...

3) Efectos de obturación de paso libre de luz.

4) Pobre transmisión del solvente.

5) Interacción con el solvente (hidrólisis).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dentro del análisis de calidad de tabletas de senósidos A/B para el ensayo del contenido de principio activo se utilizan generalmente, los métodos que para tal efecto están reportados en farmacopeas. La farmacopea Británica (1) proporciona un método espectrofotométrico que requiere de una extracción previa del principio activo con cloroformo, hidróxido de potasio y ácido clorhídrico. Este método implica varios pasos que frecuentemente dan lugar a errores de tipo determinado y por consiguiente a imprecisiones. Además comparandolo con el método volumétrico resulta más costoso en función de tiempo del analista, reactivos y equipos utilizados.

La farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (27) establece tanto para el ensayo de materia prima como de principio activo en tabletas, un método volumétrico con ácido acético glacial, temperatura controlada y protección de la luz durante todo el procedimiento. Este método es de costo analítico bajo sin embargo no es específico.

Por otra parte, la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (11) establece un nuevo método para el ensayo de materia prima y tabletas, en el cual se requiere de disolventes y equipo que por su alto costo, lo hacen inaccesible para Representaciones Mex-América, S.A..

En base a estos planteamientos, y como una necesidad de Laboratorios Farmaceúticos. Representaciones Mex-América, y conociendo la solubilidad de los senósidos A/B en metanol donde presenta un coeficiente de extinción E 1%, 1 cm a 263 nm, se decidió validar el método de ensayo para principio activo que fuera sencillo, sensible, preciso y de bajo costo. Además que fuera útil para el ensayo de productos manufacturados en el país.

III. OBJETIVOS.

1.- OBJETIVO PRINCIPAL. Validar el método espectrofotométrico desarrollado por Representaciones Mex-América, S.A. para emplearlo como método de rutina en el laboratorio de control de calidad para cuantificar senósidos A/B tanto en materia prima como tabletas.

2.- Calificar y calibrar el equipo empleado en [1].

3.- Obtener la linealidad y precisión del sistema.

IV. HIPOTESIS

Si en los resultados obtenidos se muestra que en el método espectrofotométrico los excipientes. productos de degradación u otras moléculas no interfieren en el ensayo de senósidos A/B, y además el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99, la ordenada al origen igual a cero, la pendiente es igual a uno y el coeficiente de variación es menor o igual a 3%, entonces el método es lineal, preciso, exacto y específico, por lo tanto puede ser empleado como método de rutina en el laboratorio.

V. PARTE EXPERIMENTAL.

A. MATERIAL Y EQUIPO

1. MATERIAL	DESCRIPCIÓN
matraz volúmetrico	1000 ml
probeta	100 ml
barra de agitacion	1 pulgada
vasos de precipitado	250 ml
espátula de acero inoxidable	
matraz volumétrico	100 ml 50 ml
pipetas volumétricas	1 ml

2. SUSTANCIAS

Senósidos A/B	Almidón de maiz
Bicarbonato de Sodio	Polivinilpirrolidona
Avicel pH 101	Agua destilada
Lauril Sulfato de Sodio	Metanol
Cab-o-sil	Etanol

3. EQUIPO	DESCRIPCIÓN
Balanza	Unimatic-30100
Agitador magnético	Pc-353
Espectrofotómetro	Bausch&Lomb Spectronic-21
Parrilla eléctrica de calentamiento	Termolyne 1000

B. PROCEDIMIENTO.

1. Se califica y calibra el equipo como se indica en el anexo 2.

2. Preparación del reactivo de bicarbonato de sodio:

Se pesa 1.66 g de bicarbonato de sodio en un matraz volumétrico de 1000 ml, se adiciona 330 ml de agua, se agita perfectamente hasta disolución completa y se lleva al volumen con metanol.

3. Preparación de la muestra:

Se pesa la muestra a analizar se coloca en un matraz volumétrico de 100 ml y se agrega 75 ml del reactivo de bicarbonato de sodio, se agita durante 15 minutos, se calienta ligeramente hasta completa disolución, se enfria y se afora con el mismo reactivo. Se toma de esta solución 5 ml y se lleva a un volumen de 50 ml con el mismo reactivo. Se lee a 263 nm.

4. Se obtiene la linealidad y precisión del sistema de acuerdo al anexo 2.

5. Se obtiene especificidad, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad del método volumétrico para cuantificar senósidos A/B por espectrofotometria.

VI. RESULTADOS

A. ESPECIFICIDAD

Se prepara el estándar, placebo y placebo cargado como se indica en el procedimiento [3], y se mide la respuesta para cada uno.

Muestra	Respuesta
Placebo	No da respuesta
Estándar	Da respuesta 86.8%
Placebo cargado Placebo + 0.6 g de senósidos A/B	Da respuesta 84.3%

B. PRECISIÓN
(Repetibilidad)

Para conocer la precisión (repetibilidad) del método se efectúa la evaluación estadística del mismo con los resultados obtenidos de 15 determinaciones, con placebos cargados al 100% de la concentración teórica de senósidos A/B, y se realiza por el mismo analista. Los resultados se presentan en la tabla siguiente:

g Adicionados (X)	g Recuperados	% de Recobro (Y)
0.641	0.645	100.62
0.618	0.608	98.38
0.620	0.620	100.00
0.620	0.620	100.00
0.619	0.595	96.15
0.621	0.620	99.84
0.605	0.608	100.49
0.610	0.595	97.54
0.618	0.620	100.32
0.622	0.632	101.61
0.610	0.608	99.67
0.620	0.620	99.67
0.622	0.620	99.68
0.625	0.620	99.20
0.620	0.608	98.06

TABLA III. Repetibilidad del método espectrofotométrico para el ensayo de senósidos A/B

Nivel de significancia (α) = 0.05

Ho: σ < 3% Hi: σ > 3%

$$x^2_{cal} = 13.50$$

$$X^2_{1-\alpha/2,\sqrt{1}} = 26.119 \qquad X^2_{\alpha/2,\sqrt{1}} = 5.629$$

Area de aceptación para Ho

13.50 < 26.12

Intervalo de confianza

0.8443 < σ < 1.8187

CV = 1.28%

Es repetible ya que se cumple con el criterio para la precisión del método.

C. EXACTITUD

La exactitud del método se evalua con los resultados obtenidos de 5 determinaciones para cada nivel de concentración adicionado a el placebo, los resultados se presentan en la tabla IV.

g Adicionados (X)	g Recuperados	% de Recobro (Y)
0.4960	0.4836	97.50
0.4959	0.4960	100.02
0.4972	0.4960	99.76
0.4964	0.4960	99.92
0.4976	0.4840	97.27
0.5615	0.5704	100.58
0.5574	0.5580	100.10
0.5578	0.5580	100.03
0.5578	0.5700	102.26
0.5578	0.5580	100.03
0.6213	0.6320	101.79
0.6205	0.6200	99.92
0.6201	0.6200	99.98
0.6201	0.6076	97.98
0.6205	0.6324	99.92
0.6832	0.6820	99.82
0.6845	0.6944	101.45
0.7097	0.6820	96.10
0.6850	0.6696	97.81
0.6800	0.6820	100.29
0.7440	0.7564	101.67
0.7437	0.7440	100.04
0.7468	0.7440	99.62
0.7476	0.7440	99.52
0.7435	0.7316	98.40

TABLA IV. Exactitud del metodo espectrofotométrico para el ensayo de senósidos A/B.

$$Ho: \mu = 100\% \qquad Hi: \mu <> 100\%$$

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

$$t_{tab}(0.975) = \pm 2.0639 \qquad t_{cal} = -0.8136$$

Área de aceptación para Ho

$$-2.0639 < -0.8136 < 2.0639$$

Intervalo de confianza

$$99.12 < \bar{X} < 100.38$$

$$CV = 1.53\%$$

El método es exacto, ya que $t_{cal} < t_{1-\alpha/2,\sqrt{1}}$ y el coeficiente de variación es menor del 3%.

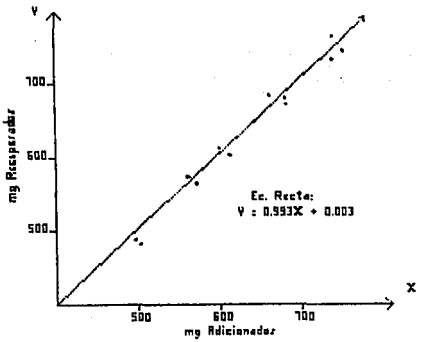
D. LINEALIDAD

Con el objeto de conocer si el método espectrofotométrico sigue una relación lineal, diferentes cantidades conocidas de senósidos A/B se adicionan a una misma cantidad del placebo, y se realizan 5 determinaciones para cada nivel de concentracion (80, 90, 100, 110 y 120%). Los resultados se muestran en la tabla V.

% Adicionado	g Adicionados (X)	g Recuperados (Y)
	0.4960	0.4836
	0.4959	0.4960
80.00	0.4972	0.4960
	0.4964	0.4960
	0.4976	0.4840
	0.5615	0.5704
	0.5574	0.5580
90.00	0.5578	0.5580
	0.5578	0.5700
	0.5578	0.5580
	0.6213	0.6320
	0.6205	0.6200
100.00	0.6201	0.6200
	0.6201	0.6076
	0.6205	0.6200
	0.6632	0.6820
	0.6845	0.6944
110.00	0.7097	0.6820
	0.6850	0.6696
	0.6800	0.6820
	0.7440	0.7564
120.00	0.7437	0.7440
	0.7468	0.7440
	0.7476	0.7440
	0.7435	0.7316

TABLA V. Linealidad del método espectrofotométrico para el ensayo de senósidos A/B

FIGURA 2. Linealidad del método espectrofotométrico para senósidos A/B (cinco determinaciones por nivel de concentración).



$B = 0.9931$ $A = 0.003$ $PR = 97.75\%$

$R^2 = 0.988$ $R = 0.994$ $CV = 1.53\%$

Inferencia para la ordenada al origen Ao

Ho: Ao = 0 Hi: Ao <> 0

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

$t_{cal} = 0.2750$ $t_{0.975,23} = \pm 2.0687$

grados de libertad (g.l.) = n - 2

Área de aceptación para Ho

$-2.0687 < 0.2750 < 2.0687$

Nuestro metodo posee una ordenada al origen que podemos considerar igual a cero.

Intervalo de confianza

$-0.0195 < A < 0.0255$

Inferencia para la pendiente Bo

Ho: Bo = 1 Hi: Bo <> 1

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

$t_{cal} = -0.0423$ $t_{0.975,23} = 2.0687$

Área de aceptación para Ho

$-2.0687 < t_{cal} < 2.0687$

Nuestro método posee una pendiente que podemos considerar igual a uno.

Intervalo de confianza

$0.9568 < B < 1.0292$

Ya que $A \cong 0$, $B \cong 1$, $r^2 > 0.98$, $r > 0.99$, $CV = 1.53\%$ y $PR = 99.75\%$ se cumple con los criterios para linealidad del método.

Recta de validación

$$\hat{Y} = 0.9931X + 0.003$$

$$Y = BX + A + \Sigma 1$$

$$Y = 0.9931X + 0.003 + 0.1198$$

La linealidad del método espectrofotométrico se evalúa mediante la tabla de análisis de varianza siguiente:

A N A D E V A
(Linealidad)

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	F DE CALCULO	F DE TABLAS
REGRESIÓN	2-1=1	0.1955	0.1955	3204.9	4.28
ERROR DE REGRESIÓN	25-2=23	0.0014	$6.1*10^{-5}$		
FALTA DE AJUSTE	23-20=3	$2.2*10^{-5}$	$7.3*10^{-5}$	1.0265	3.10
ERROR PURO	(5-1)5=20	$1.4*10^{-3}$	$7.0*10^{-5}$		

Fr > F(glr/gler; 0.01): Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Ffa < F(glfa/glep; 0.05): No existe falta de ajuste a la relación lineal, simple cantidad adicionada cantidad recuperada.

E. REPRODUCIBILIDAD.

La evaluación de reproducibilidad del método se efectuó por dos analistas en dos días diferentes, llevando a cabo 5 determinaciones por día por analista. La tabla VI muestra los resultados de los por cientos de recobro obtenidos.

	Día 1	Día 2	
	% de Recobro	% de Recobro	
Analista 1	99.64	96.98	
	102.01	98.47	
	100.32	98.53	
	98.96	98.67	
	97.58	99.61	
	498.51	491.96	990.47
	Día 1	Día 2	
	% de Recobro	% de Recobro	
Analista 2	99.00	98.63	
	102.33	98.21	
	100.64	98.06	
	98.47	98.00	
	101.21	99.03	
	501.65	491.93	993.58
			1984.05

TABLA VI. Reproducibilidad del método espectrofotométrico para el ensayo de senósidos A/B.

Para evaluar estadísticamente la reproducibilidad del método espectrofotométrico se emplea en el ensayo de senósidos A/B, se utilizó la tabla de análisis de varianza ANADEVA.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	F DE CALCULO	F DE TABLAS
ANALISTA Ai	2-1=1	0.48	0.48	0.0725	38.51
DIA DJ(i)	(2-1)2=2	13.24	6.62	0.4755	4.69
ERROR EK(ij)	(2)(2) (5-1)=16	222.73	13.92		

$F_{cal_A} < F_{tab_A}$ $F_{cal_D} < F_{tab_D}$

Por lo tanto se concluye que el método es reproducible no existe efecto por analista ni por dia.

F. SENSIBILIDAD

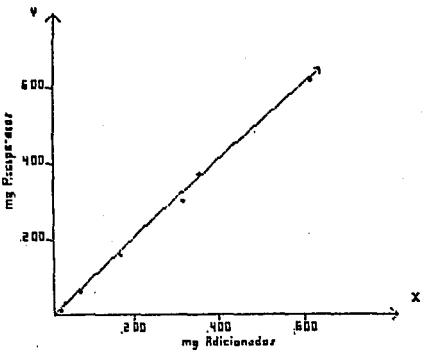
Para conocer la sensibilidad del método se adicionaron cantidades conocidas de senósidos A/B, las cuales se fueron disminuyendo en cada determinacion.

g Adicionados (X)	g Recuperados (Y)	% de Recobro (Z)
0.6210	0.6200	99.84
0.3700	0.3470	93.84
0.3100	0.3100	100.00
0.1600	0.1612	100.75
0.0620	0.0620	100.00
0.0310	0.0248	80.00
0.0160	0.0124	77.50

TABLA VII. Sensibilidad del método espectrofotométrico para el ensayo de senósidos A/B.

Se concluye que el método es sensible puesto que mide 0.01 g de la muestra.

FIGURA 3. Sensibilidad del método espectrofotométrico para senósidos A/B.



VII. ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados muestran que el método es especifico ya que no existe interferencia de los excipientes de la materia prima en el ensayo de la cuantificación de los senósidos A/B. Para la evaluación de la precisión (repetibilidad) del método se obtuvo un CV de 1.28%, y cumple con el criterio de precisión del método.

El método es reproducible, ya que el análisis estadistico, demostró que no existe efecto por dia ni por analista.

Para la exactitud del método el CV = 1.53% , y el intervalo de confianza incluye el 100%, lo cual indica que el método es exacto.

En la determinación de linealidad se encontró que el método tiene una ordenada al origen de 0.003, pendiente de 0.9931, los cuales puedon ser consideradas estadisticamente igual a cero y a uno respectivamente, R = 0.9948 y el CV = 1.53% ; bajo estos criterios, los cuales establece la legislación sanitaria el método es lineal, y la recta de validación es: Y=0.9931X-0.003. Utilizando la tabla de análisis de varianza, se puede observar que el modelo de regresión lineal propuesto explica adecuadamente el comportamiento de los datos experimentales, y no existe falta de ajuste.

Por medio de este método se cuantificó hasta un 2% de senósidos A/B respecto al etiquetado. Porque si se continúa disminuyendo la cantidad de senósidos A/B, el error en la cuantificación de éste, cada vez es mayor.

VIII.- CONCLUSION

El método espectrofotométrico empleado en la cuantificación de senósidos A/B se caracteriza por su simplicidad y bajo costo, lo cual lo hace útil tanto para el ensayo de materia prima como de contenido de principio activo en tabletas. Además de ser un método rápido y eficaz.

De acuerdo a los resultados obtenidos para este método espectrofotométrico empleado en el ensayo de senósidos A/B podemos concluir que es un método específicò, exacto, preciso, lineal y práctico, ya que cada uno de estos parámetros analíticos cumplen con los criterios de los requisitos mínimos de validación. Por lo tanto puede ser empleado como método de rutina en el laboratorio, bajo las mismas condiciones de trabajo empleadas en la validación del método.

ANEXO I

FÓRMULAS

Precisión (repetibilidad)

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

Área de aceptación

$$X^2_{cal} < X^2_{tab}$$

Intervalo de confianza

$$\frac{(n.-1)\ S^2}{X^2_{1-\alpha/2}} < \sigma > \frac{(n-1)S^2}{X^2_{\alpha/2}}$$

$$CV = \frac{n(Y^2) - (Y)^2}{n(n-1)\cdot Y}^{1/2} * 100$$

Exactitud

$$t_{cal} = \frac{\hat{X} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$

Área de aceptación

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza

$$\bar{X} + t_{\alpha/2} * S/\sqrt{n} < X < t_{1-\alpha/2} * S/\sqrt{n} + \bar{X}$$

Linealidad

$$B = \text{Pendiente} \qquad B = \frac{n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

$$A = \text{Ordenada al origen} \qquad A = \frac{(\Sigma Y)\,\Sigma X^2) - (\Sigma X)\,(\Sigma Y)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

$$S_{Y/X} = \frac{\Sigma Y^2 - A\,(\Sigma Y) - B\,(\Sigma XY)}{n}$$

$$\hat{S}_{Y/X} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} * S_{Y/X}$$

Fórmulas para la ordenada al origen

$$t_{cal} = \frac{A - A_o}{S_{Y/X}\sqrt{\frac{x^2}{n\,(x_i - x)^2}}}$$

Área de aceptación para Ho

$$t_{\alpha/2} < t_{cal} < t_{1-\alpha/2}$$

Intervalo de Confianza

$$A + t_{\alpha/2} * \hat{S}_{Y/X}\sqrt{\frac{x^2}{n\Sigma(x_i - x)^2}} < A < A + t_{1-\alpha/2} * \hat{S}_{Y/X}\sqrt{\frac{x^2}{n\Sigma(x_i - x)^2}}$$

Fórmula para la pendiente

$$t_{cal} = \frac{(b - B_o)\;S_x\;\sqrt{n-1}}{S_{Y/X}}$$

Área de aceptación para Ho

$$t_{\alpha/2} < t_{cal} < t_{1-\alpha/2}$$

Intervalo de confianza

$$B + t_{\alpha/2} * \frac{\hat{S}_{Y/X}}{S_x\sqrt{n-1}} < B < B * t_{1-\alpha/2} * \frac{\hat{S}_{Y/X}}{S_x\sqrt{n-1}}$$

$$R^2 = \frac{n\ (\Sigma XY) - (\Sigma X)\ (\Sigma Y)^2}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2\ \ n(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2}$$

Recta de Validación

$$Y = BX + A + E_{(i)}$$

$E_{(i)}$ = Error experimental

$$E_{(i)} = \Sigma(Y_i - \hat{Y})$$

$$\hat{Y} = BX_{exp.} + A$$

A N A D E V A
(Reproducibilidad)

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	F DE CALCULO
ANALISTA Ai	a-1	$\frac{\Sigma Yi^2..}{bc} - \frac{Y^2...}{abc}$	SCA/a-1	MCA/MCDJ(i)
DÍA DJ(i)	(b-1)a	$\frac{\Sigma Yj^2..}{ac} - \frac{Y^2...}{abc}$	SCD/(b-1)a	MCD/MCEK(ij)
ERROR EK(ij)	(c-1)ab	$\Sigma Yijk^2 - \frac{\Sigma Yij^2}{c}$	SCE/ab(c-1)	

CRITERIO:

Si Fa < Fgla/gle; 0.05 — El método analitico es reproducible por los analistas.

Si Fa ≥ Fgla/gld; 0.05 — El método analitico no es reproducible por los analistas.

Si Fd < Fgld/gle; 0.05 — El método analitico es reproducible en distintos dias por un mismo analista.

Si Fd ≥ Fgld/gle; 0.05 — El método analitico no es reproducible en distintos dias por un mismo analista.

A N A D E V A

(Linealidad)

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F DE CÁLCULO
REGRESIÓN	1	SCr	SCr	Fr = SCr/MCer
ERROR DE REGRESIÓN	n - 2	SCer	SCer/gler	
FALTA DE AJUSTE	(n-2) - t(r-1)	SCfa	SCfa/glfa	Ffa = MCfa/MCep
ERROR PURO	t(r-1)	SCep	SCep/glep	

CRITERIO:

Si Fr ≥ Fglr/gler; 0.01	Existe una relacion altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.
Si Fr < Fglr/gler; 0.01	No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.
Si Ffa ≥ Fglr/gler; 0.05	Existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada cantidad recuperada.
Si Ffa < Fglr/gler; 0.05	No existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada cantidad recuperada.

ANEXO II

CALIFICACIÓN Y CALIBRACIÓN DE BALANZA ANALITICA.

Fecha: 4-abril-1990

Area: Control de calidad

Marca: UNIMATIC

Capacidad: 200 g

Sensibilidad: 1.0 mg

Patron de comparación:

Marca de pesas con capacidad para 1.000 kg

Fecha de calibración: 4-abril-1990

Vigencia de certificado: 1 año

Determinaciones:

1) Linealidad .

Datos		Propiedad medida: gramos			
x_1:	0.200g	y_{11}:	0.2001	y_{21}:	0.1997
x_2:	1.000g	y_{12}:	1.0006	y_{22}:	1.0007
x_3:	10.000g	y_{13}:	10.0006	y_{23}:	10.0007
x_4:	50.000g	y_{14}:	50.0008	y_{24}:	50.0005
x_5:	100.000g	y_{15}:	100.0020	y_{25}:	100.0021

RESULTADOS:		CRITERIO:	
b = 0.0008	R > 0.99	b = 0	R > 0.99
m = 1.0000	R^2 > 0.98	m = 1	R^2> 0.98
CV = 0.0609%		CV ≤ 3%	

CONCLUSIÓN: Se cumple con los criterios para la linelidad del sistema.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

2) Precisión.

Pesa utilizada: 0.100g N = 6

X_1= 0.1005g X_2= 0.1000g X_3= 0.1001g

X_5= 0.1002g X_4= 0.1001g X_4= 0.1001g

RESULTADOS:

$\bar{x}$ = 0.1002 S = 0.0132

S^2 = $1.75X10^{-5}$ CV = 0.1748%

CRITERIO: CV ≤ 1.5%

CONCLUSIÓN: Se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

CALIFICACIÓN Y CALIBRACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO

Fecha: 10-Abril-90

Marca: Baush & Lomb Modelo: Spectronic 21

Rango: 200-1000nm

Determinaciones:

Las siguientes pruebas se incluyen para que el operador compruebe que el aparato está en buenas condiciones de trabajo.

1.- Aguja en cero con el aparato apagado.

2.- Linealidad.

a).- Solución de referencia; Permanganato de potasio (conc. 0.066mg/ml).

b).- Longitud de onda seleccionada para la prueba: 525 nm.

c).- Propiedad medida: absorbancia.

DATOS:

X_1	1.32	Y_{11}	0.200	Y_{12}	0.198
X_2	2.64	Y_{12}	0.395	Y_{22}	0.395
X_3	3.96	Y_{13}	0.590	Y_{23}	0.590
X_4	5.28	Y_{14}	0.780	Y_{24}	0.785
X_5	6.60	Y_{15}	0.980	Y_{25}	0.980

RESULTADOS:		CRITERIO:	
m = 1.0	$R^2 > 0.998$	m = 1	$R^2 > 0.98$
b = 0.0048	R > 0.9994	b = 0	R > 0.99
CV = 0.7033%		CV ≤ 3%	

CONCLUSIÓN: El sistema demuestra ser lineal debido a que los resultados obtenidos son proporcionales dentro del rango de prueba.

3.- Determinación de Escala Fotométrica:

Solución de Referencia: Dicromato de Potasio (conc.0.066 mg/ml).

LONGITUD DE ONDA	LIMITES DE ABSORBANCIA	RESULTADOS
235	0.740-0.756	0.750
257	0.856-0.874	0.850
313	0.289-0.295	0.280
350	0.634-0.646	0.645

CONCLUSIÓN: Las lecturas obtenidas estan entre los limites establecidos, por lo que se resume que el aparato está en buenas condiciones de operación.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) se utiliza cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón, y se hacen análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar depende del proposito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un farmaco en forma farmacéutica, debe estar incluida la concentración seleccionada como 100%. Se considera el 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporcione una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

DATOS

Absorción ultravioleta a 263 nm, en reactivo de bicarbonato de sodio-metanol.

Estandar secundario de senósidos A/B potencia 4.072%.

mg %	Propiedad medida	
Solucion estandar	Absorbancia	
0.24	y_{11}:0.18	y_{21}:0.19
0.36	y_{12}:0.28	y_{22}:0.29
0.48	y_{13}:0.38	y_{23}:0.38
0.60	y_{14}:0.47	y_{24}:0.48
0.72	y_{15}:0.58	y_{25}:0.60

RESULTADOS:		CRITERIO	
$R = 1.0039$	$R^2 = 1.0078$	$R \geq 0.99$	$R^2 \geq 0.98$
$m = 0.8392$	$b = 0.0198$	$m = 1$	$b = 0$
$CV = 2.71\%$		$CV \leq 3\%$	

CONCLUSIÓN:

Ya que $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$, y $CV < 3\%$, se cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

DATOS

Propiedad medida = Absorbancia

0.48	0.50	0.49
0.50	0.49	0.50

RESULTADO:	CRITERIO:
$CV = 1.6551\%$	$CV \leq 3\%$

CONCLUSIÓN:

Se cumple con el criterio para la precision del sistema.

IX.- BIBLIOGRAFIA

1.- British Pharmacopeia 1980. Vol I y II. Her Malfesty's Stationary Office. University Press. England. 1980.

2.- Byers T. E. Validation: A Sistemmatic Approach to Quality Assurance. Pharm-Tech Conferencee. 6104 Beech Tree Drive Alexandria Virginia 22310.

3.- Cattaneo Donald J., "Plant Validation Aceptance Criteria ". Pharmaceutical Enginnering, 8 (4). 9-11 (1988).

4.- Cavenaghi L., Gallo G.G. & Leal G. M. Statistical evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control medicines drug development & industrial pharmacy. 13 (14).2571-2615 (1987).

5.- Chatterjee S. and Price B. Regression analysis by example. Jhon Wiley and sons. USA (1976).

6.- Cemell Pons José, La Validación: Una filosofía y un sistema, Conferencia pronunciada en las VI Jornadas Nacionales de la AEFI. Pamplina 20-22 de junio 1985, pág. 220-226.

7.- Comite de elaboración de Guias Oficiales de Validacion. Requisitos minimos para la validación de metodos analiticos. Editorial Rhone Poulenc Pharma de México, S.A. de C.V.

8.- Diario oficial de la federación Tomo CDXII No. 11 Mexico. D.F.. Lunes 18 de Enero de 1988.

9.- Draper N. R. and Smith H. Applied regression analysis Jhon Wilelly and sons USA (1966)

10.- Duarte J. E. & Vest D.K.;Validating alternate laboratory assay methods pharmaceutical technology May (1979), 60-66

11.- Espectroscopia UV y visible
Rao C.N.R. DSc; PhD; FRIC; FASc.
Editorial Alhambra, S.A., Madrid 1970. pags 401-410 y 432-434.

12.- Fischer. Compendio de Análisis Quimico Cuantitativo. Ed. Interamericana S.A. de C.V..
México, D.F. 1971 pág 1-17.

13.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos Comisión Revisora Permanente de la Farmacopea Nacional. Ed. 5a. México, 1974.

14.- Finkelson Martin J., "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories", Pharmaceutical Thechnology, March, 75-78, (1986).

15.- Guerra Johny, "Validation of analyutical methods by FDA Laboratories", PharmaceuticalThechnology, March, 84, 74-75 (1986).

16.- Kreyszig E. Introduccion a la estadistica matematica principios y métodos. Ed. Limusa.

17.- Juarez Rubi R., "Validación de un Metodo Analitico para concentrado de cobre, tesis. U.N.A.M-. E.N.E.P. "Zaragoza".

18.- Lark P.D. Application of statistical analysis to analytical data analytical chemistry 26(11), 1714-5.

19.- Linnig F. J.; Mandel J. & Peterson J.JM. A plan for studying the accuracy and precision of an analytical procedures Analytical Chemistry 26(7), 1102-1110, (1954).

20.- Loftus T. Bernard and Na h A. Robert. Pharmaceutical Process Validation. Moral Dekker, Inc. New York and Basel.

21.- Mandel J. k& Linnig F.J. Study of accuracy in chemical analysis using linear calibration curves Analytical Chemistry 29 (5), 743-749, (1957).

22.- Márquez de Cantu Ma. J. Probabilidad y Estadistica para Ciencias Quimico Biológicas U.N.A.M. 1988.

23.- Midgley D. Criterion for judging the acceptability of analytical mehods. Analytical Chemistry 49 (3), 510-2, (1977).

24.- Mitchelll J.A. Control of the accuracy and precision of industrial test and analyses Journal Chemical Society 19 (12), 9617, (1947).

25.- PMA'S Validation Advisory Committee, "Process Validation Concepts for drug products", Pharmaceutical Thechnology , September 78-82 (1985).

26.- Remington I Farmacia 17a. Ed. Editorial Medica Panamericana Buenos Aires 1985.

27.- Roman Garcia Fernando. Validación de procesos para productos farmacéuticos no estérilos. Revista mexicana de Ciencias Farmaceuticas. Searle de México S.A., México, D.F. 1988.

28.- Taylor John K., "Validation of Analytical Methods". Analytical Chemistry, 55 (6) 600A-600A (1983).

29 The Index Merck, Ninth Edition. Published by Merck Co., U.S.A., 796, 1018, 1126 (1982).

30.- USP XX. NF XV. Addendum. a, 25. Authority of the United States Prarmacopeial Convention. Inc. Mack Publishing Company. USA, 1983.

31.- Vanderwelen, A.J. And Hardwedge, E.A."Guidelines for Assay Validation", Pharmaceutical Thechnology, 3, 66-76 (1982).

32.- Velázquez P.P.; González H.; Ramos C. & Madrigal M. Desarrollo y validación de un método analítico por espectrofotometría para el control de Calidad y estabilidad en tabletas que contienen acido acetilsalicílico Revista Mexicana de Ciencias Farmaceúticas 19(2), 19-22, (1988).