



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO PARA  
CUANTIFICAR FOSFATO DE DEXAMETASONA SODICA  
Y CLORHIDRATO DE FENILEFRINA EN SOLUCION  
OFTALMICA

T E S I S

Que para obtener el Titulo de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

SANDRA LILIA CERON JUAREZ



México, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA LE OR:GEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

1. Introducción
2. Generalidades
  - 2.1. Espectroscopía de absorción
  - 2.2. Monografías de los principios activos
    - 21-fosfato de dexametasona sódica
    - Clorhidrato de fenilefrina
  - 2.3. Validación de métodos analíticos
3. Parte experimental
  - 3.1. Reactivos y soluciones
  - 3.2. Métodos analíticos para 21-fosfato de dexametasona sódica
  - 3.3. Métodos analíticos para clorhidrato de fenilefrina
  - 3.4. Resultados de la validación del método analítico para 21-fosfato de dexametasona sódica y clorhidrato de fenilefrina en solución oftálmica.
4. Conclusiones
5. Bibliografía.

## 1. INTRODUCCION

El desarrollo de la Industria Farmacéutica se basa principalmente en la elaboración de medicamentos específicos y de excelente calidad. Para que esto sea posible es necesario entre otros factores; que las sustancias utilizadas en la elaboración de medicamentos cumplan con las normas de calidad Oficiales.

El control de calidad de los mismos ha sido posible mediante el desarrollo de métodos analíticos y técnicas instrumentales de análisis cada vez más confiables y seguras.

Dada la complejidad de las diferentes formas farmacéuticas, ha sido necesario determinar el grado de confiabilidad de los métodos analíticos utilizados en el control de calidad de los medicamentos.

Es por esto que ha surgido la necesidad de incluir el proceso de validación de métodos analíticos dentro del esquema de aseguramiento de calidad de un producto farmacéutico, asegura los resultados obtenidos al valorar fármacos en diferentes formulaciones.

El presente trabajo se basa en la comprobación de las técnicas analíticas reportadas en la Literatura, entre las cuales se encuentran métodos volumétricos y espectrofotométricos.

El medicamento que se estudió en el desarrollo de este trabajo es una solución oftálmica que contiene 2l-fosfato de Dexametasona Sódica y Clorhidrato de Fenilefrina para lo cual se eligió espectrofotometría Ultravioleta-Visible porque se adaptan al equipo con que cuenta la empresa y además ofrecen una especificidad adecuada para las aplicaciones del método analítico.

Una vez establecido el método de análisis se procedió a validarlo, estadísticamente, lo que implicó determinar los siguientes parámetros.

Los resultados mostraron que el método es confiable y aplicable al control de calidad del producto estudiado.

## 2. GENERALIDADES.

### 2.1. Espectroscopía de Absorción

La espectroscopía de absorción es indudablemente, una de las técnicas analíticas que ofrece varias ventajas en la solución de muchos problemas. Estas ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad.

En la mayor parte de los análisis espectrofotométricos cuantitativo se emplean medidas realizadas en las regiones ultravioleta (UV) y Visible (VIS) del espectro electromagnético. El requerimiento básico que el compuesto a analizar, o su derivado debe tener, es una absorción de suficiente intensidad para tener utilidad en análisis. Es necesario que la muestra no esté contaminada con sustancias capaces de interferir debido a su propia absorción.

Una forma de superar la interferencia espectral consiste en provocar un desplazamiento del espectro de absorción del compuesto que se valora hacia una zona de longitud de onda libre de bandas interferentes.

Algunas veces esto se logra con una elevación o descenso de pH del medio, otra forma es por conversión en un derivado, el cambio estructural originará generalmente un cambio espectral.

A partir de esta base se han desarrollado muchos análisis.

Se suele plantear el análisis de manera que se produzca absorción en la región visible, convirtiéndose entonces el compuesto de una sustancia incolora a un derivado fuertemente coloreado, por lo que se aplican a la solución coloreada los principios usuales del análisis espectrofotométrico y por tanto se denominará análisis colorimétrico.

## 2.2. MONOGRAFÍAS.

## 21-POSFATO DE DEXAMETASONA SODICA.

Nombre químico

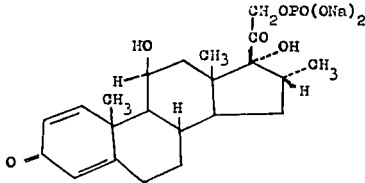
21-(fosfato dihidrogeno) disódico sal  
fosfato disódico de 9-alfa-fluoro-11beta, 17-alfa, 21-trihidroxi-  
16-alfa-metilpregnadien-1,4-diona-3, 20.

$C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$  ; peso molecular 516.41

Nombre genérico.

ak-dex, badex, dalcron, dexabene, dezone, solu-decadron, orgadron  
colvasone, soldesam.

La fórmula estructural puede ser representada de la siguiente  
manera;



DESCRIPCIÓN: Polvo blanco o ligeramente amarillo, inodoro o  
con un ligero olor alcohólico, higroscópico

pH entre 7.5 y 10.5 determinada en una solución al 1.0%

SOLUBILIDAD: Fácilmente soluble en agua, ligeramente solu-  
ble en etanol; muy ligeramente soluble en dioxano; insoluble en  
cloroformo y éter.

**IDENTIFICACION**

Punto de fusión: 233°C - 235°C

Rotación óptica: En solución de concentración 10 mg/ml 74°  
y 82°

Espectrofotometría Ultravioleta: como 21-fosfato de dexametasona sódica máxima absorbancia 238 nm

Como base o sea dexametasona b en solución con metanol presenta máximos de absorción en las siguientes longitudes de onda

$$240 \text{ nm } *E_{1\text{cm}}^{1\%} = 355$$

$$238 \text{ nm } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 392$$

$$240 \text{ nm } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 380-410$$

y en ácido sulfúrico concentrado

$$262 \text{ nm } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 444$$

$$305 \text{ nm } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 308$$

$$263 \text{ nm } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 422 - 455$$

- a) dos horas en ácido sulfúrico concentrado
- b) en condiciones no específicas

\* La absorbancia de una sustancia a una longitud de onda determinada en una solución de concentración unidad.



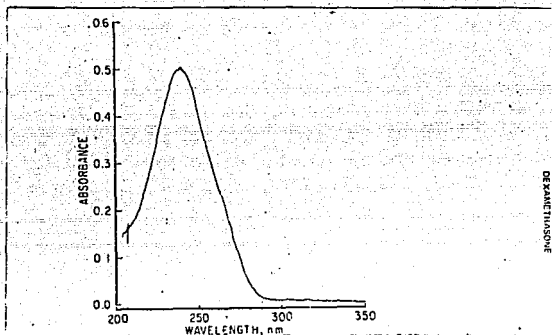


Figura 1. Espectro de absorción ultravioleta de dexametasona en me tanol a una concentración de 0.00127% longitud de onda 240 nm y  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 393$  (Merck Std No 8415-76)

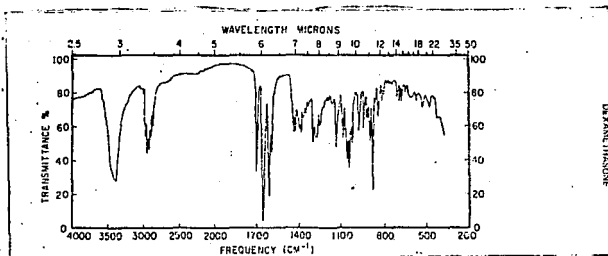


Figura 2. Espectro Infrarrojo de Dexametasona

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

### a) Análisis espectrofotométricos.

Espectrofotometría ultravioleta. La dexametasona 21-fosfato sódica puede ser cuantificada por comparación de las absorbancias de la muestra en cloruro de metileno a 236nm con la obtenida de una sustancia de referencia (s ref) en cloruro de metileno en las mismas condiciones y de concentración conocida a la misma longitud de onda.

Espectrofotometría visible. Mediante el desarrollo de color producido por la solución de azul de tetrazolio y de hidróxido de tetrametilamonio se utiliza como disolvente cloroformo a una longitud de onda de 525 nm

**CLORHIDRATO DE FENILEFRINA.**

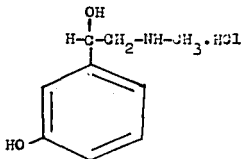
Nombre Químico.

(R)-3-hidroxi-alfa- (metilemino) metil bencenometanol clorhidrato; 1-m-hidroxi-alfa-(metilamino)metil alcohol benzilico clorhidratado. Fórmula y peso molecular  $C_9H_{14}ClNO_2$  o  $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$   
203.67

Nombre Genérico.

clorhidrato de fenilefrina, adrianol, oftalfrene, prefin.

La fórmula estructural puede ser representada de la siguiente manera.



DESCRIPCION. Polvo cristalino blanco o prácticamente blanco inodoros y con sabor amargo.

CONSTANTE DE DISOCIACION  $pK_1$  3.77  $pK_2$  9.84

SOLUBILIDAD. Fácilmente soluble en agua y alcohol

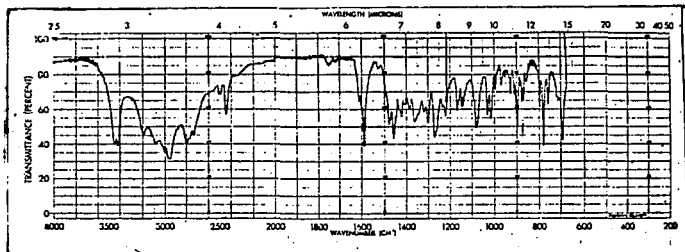
IDENTIFICACION.

Punto de fusión: entre (140 - 145)°C

Rotación óptica: entre (-42 y -47.5)°

## Espectrofotometría Ultravioleta

solución	longitud maxima (nm)	E X 10 <sup>3</sup>
0.05 N HCl	216	5.91
	274	1.81
	279s	1.65
0.05N NaOH	239	8.95
	292.5	3.04



**Figura 1: Clorhidrato de fenilefrina; Espectro IR de 13mm. KBr  
obteniendose de 1 mg de muestra dispersa en 200mg KBr,  
Instrumento: Perkin-Elmer 621**

**ESTABILIDAD:** el clorhidrato de fenilefrina es estable como sólido, en solución acuosa a un pH menor de 7 ; inestable a un pH mayor de 7.

**MÉTODOS DE ANÁLISIS****a) Análisis espectrofotométrico.**

Análisis directo por espectrofotometría de ultravioleta a una longitud de onda de 272 nm, comparada con la absorbancia obtenida de una sustancia de referencia de concentración conocida y a la misma longitud de onda.

**Análisis colorimétrico.**

Espectrofotometría visible, mediante el desarrollo de color producido por la solución de 4-aminoantipirina en medio alcalino y la presencia de ferricianuro de potasio, cuantificada por comparación de las absorbancias de la muestra con la obtenida de una sustancia de referencia en el mismo medio de concentración conocida y a la misma longitud de onda a 490 nm.

b) Titulación iodométrica, determinación del iodo liberado con solución de tiosulfato de sodio 0.1N utilizando almidón como indicador.

**c) Cromatografía.**

- Cromatografía en papel
- Cromatografía de líquidos
- Cromatografía de gases

Cromatografía en columna utilizando como adsorbente tierra silícea cromatográfica tratada con ácido clorhídrico al 10% y como fase móvil ácido sulfúrico 1:350

Cuantificada por comparación de las absorbancias de la muestra con la obtenida de una sustancia de referencia en el mismo medio (ácido sulfúrico 1:350) de concentración conocida y a una longitud

de onda de máxima absorbancia de 271 nm y a una longitud de mínima absorbancia de 292 nm y 238 nm, usando ácido sulfúrico (1:350) como blanco.

### 2.3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS:

La validación tiene como objetivo el certificar la validez de los métodos de análisis empleados rutinariamente, para su absoluta confiabilidad, y consiste en determinar a través de estudios de laboratorio la exactitud y establecer la precisión con la cual se cuantifica el (los) principio (s) activo (s) contenidos en una formulación.

La validación de métodos analíticos es el proceso para determinar la confiabilidad de una metodología dada mediante los datos proporcionales por este proceso. El proceso de validación es la medida de funcionamiento de un sistema analítico total.

En otras palabras, las investigaciones deben asegurar que el método, los instrumentos, los solventes, reactivos y cualquier otra cosa empleada durante el análisis, son adecuadas para el compuesto que está siendo analizado. La validación del método específica, que los métodos desarrollados deben ser verificados bajo condiciones actuales de uso y que, si surgen después variaciones en la metodología existente, deben ser sujetos a procesos de revalidación.

Cualquier variación en el procedimiento actual debe ser documentada y sujeta a su propia validación. La forma clásica de exactitud para iniciar la validación de un método analítico es analizar muestras de referencia que son similares en todos los aspectos de la muestra excepto en la forma de adición de principio ac-

tivo y comparar los resultados obtenidos contra esperados.

Se pueden emplear diferentes métodos de adición de estándar de referencia para determinar exactitud del método analizado

En el método de recobro de (placebo adicionado) el ingrediente activo se añade a la mezcla de los excipientes en un rango determinado.

La mezcla resultante es comparada contra los resultados esperados. La diferencia entre la muestra así obtenida y la muestra original es una medida de la cantidad de estándar no recobrado por el análisis.

La exactitud de un método puede variar a través de un rango de posibles concentraciones. Esto significa que la exactitud es determinada a través de un rango que puede ir desde el 25% hasta el 150% del resultado esperado por la valoración; así mismo se determina la linealidad considerando la variación en la cantidad de principio activo recuperado por el análisis como una función de la cantidad de principio activo contenida en la muestra. Cualquier desviación de linealidad indica que el método no trabaja apropiadamente para muestras con estas concentraciones de principio activo. En tales casos; los Investigadores deben modificar y revalidar el método en estudio o cambiarlo completamente.

Otro criterio para la validación de un método es su ESPECIFICIDAD estrictamente necesaria en el caso de un método desarrollado para el seguimiento de la estabilidad del producto. Idealmente esto significa que el método está libre de interferencia de cualquier tipo. En particular los excipientes de la formulación no deben interferir con la medida de la potencia del fármaco.

Es necesario probar también todos los ingredientes que están contenidos en la formulación sin el ingrediente activo, lo cual dará una medida de la especificidad.

Finalmente, ligeras variaciones en las condiciones experimentales no deben tener efectos significativos en los resultados analíticos producidos por el método. En otras palabras, el método debe ser robusto (ser tolerante o tener tolerancia) por lo tanto; es esencial una validación adecuada para asegurar que un procedimiento analítico es el apropiado en la resolución del problema específico que se utilizara.

La Industria Farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo es decir el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación.

Los parámetros comúnmente utilizados en la validación de métodos analíticos son los siguientes.



**A) ESPECIFICIDAD.**

Especificidad es la habilidad de un método analítico, para obtener una respuesta debida unicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Las posibles interferencias pueden ser, excipientes, sustancias semejantes al activo, productos de degradación.

Es necesario confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar y cuantificar la sustancia de interés independientemente de cualquier interferencia presente.

De no ser así, se tendra que optimizar el método o desarrollar otro.

El método no debe de responder a los placebos y su respuesta debe ser unicamente debida a la sustancia de interes.

El método debe estar exento de interferencias debido a sustancias extrañas a los principios activos de interes.

**B) LINEALIDAD DEL SISTEMA.**

Definición; es la relación que se establece mediante un modelo lineal entre una propiedad física, química y/o biológica con la cantidad del fármaco.

**Determinación:**

Se efectúa por lo menos 3 diluciones como mínimo por duplicado de manera independiente, a partir de una solución de referencia, midiendo su propiedad bajo las mismas condiciones de medición debiera estar incluido el 100% de la fórmula unitaria.

**Linealidad del sistema.** Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución de referencia utilizando cuando menos 3 diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución (respuesta contra concentración)

**Criterio.**

a) La relación entre la concentración y la propiedad medida debe ser altamente significativa

b) La ordenada al origen de la relación lineal simple, concentración - propiedad medida, debe ser estadísticamente igual a cero  $b = 0$

c) Coeficiente de determinación de la relación lineal simple debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe de ser estadísticamente significativa  $r > 0.99$   
 $r^2 > 0.98$

## EVALUACION DE LINEALIDAD.

Se realiza mediante un análisis probabilístico de varianzas de acuerdo a las siguientes fórmulas.

$$a = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{(\sum y) - a(\sum x)}{n}$$

TABLA DE ANADIVA

Fuente de variación (FV)	Grados de Libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calculado (F)
Regresión	1	$SCR = [m\sum xy + b\sum y] - \frac{(\sum y)^2}{n}$	$MCr = \frac{SCR}{GLr}$	$F_{cal} = \frac{MCr}{MGer}$
Error de regresión	$GLer = n - 2$	$SGer = \sum y^2 - m\sum xy - b\sum y$	$MGer = \frac{SGer}{GLer}$	

determinar en la tabla de la distribución " Fcritica " los valores para  $F_{crit} (GLr, GLer; 0.01)$      $F_{crit} (1, n-2; 0.01)$

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

donde:  $n = rt$      $r$  = número de replicaciones     $t$  = tratamientos  
 $n$  = número de datos     $b$  = ordenada al origen     $m$  = pendiente  
 $r^2$  = coeficiente de correlación

#### Regla de decisión para linealidad

- si  $F_{cal} \geq F_{crit}$     Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida
- si  $F_{cal} < F_{crit}$     No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida

#### EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN.

considerando las formulas presentes a continuación

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{SG_{er}}{G_{ler}}}$$

$$S_b = S_{y/x} \left[ \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

Determinar en la tabla de distribución "t" de Student el valor para  $t$  ( $n-2$ , 0.975)

donde:  $S_{y/x}$  = desviación estandar de regresión

$S_b$  = desviación estandar de la ordenada al origen

Calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen (IC(B)) por medio de la siguiente ecuación

$$IC(B) = b \pm t_{n-2, 0.975} (S_b)$$

#### C) PRECISION DEL SISTEMA

**Definición.** La precisión del sistema de medición, es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales bajo las mismas condiciones,

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación (CV)

**Determinación:** Se preparan de manera independiente por lo menos 6 diluciones a partir de la misma solución de ref. correspondiente al 100% de lo establecido en la linealidad del sistema de medición

**Criterio.**

El coeficiente de variación debe de ser menor o igual a 1.5%

#### D) LINEALIDAD DEL METODO

Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de fármaco adicionado)

Se determina con placebos adicionados del principio activo,

(placebo adicionado), cada uno de manera independiente, cuando menos a 3 diferentes concentraciones incluyendo al 100%, haciendo los análisis por duplicado de cada concentración.

#### Criterio.

Cantidad adicionada VS cantidad recuperada;  $m = 1$ ,  $b = 0$   
 $r^2 > 0.98$

Por ciento recuperado: en el IC para la media debe localizarse el 100%

El CV dependiendo del método, concentración y forma farmacéutica deberá ser  $< 3.0\%$

#### EVALUACION DE LINEALIDAD:

##### Criterios.

1) La relación lineal simple, cantidad adicionada - cantidad recuperada, debe ser altamente significativa.

2) El coeficiente de determinación  $r^2$  de la relación lineal simple de cantidad adicionada - cantidad recuperada debe ser mayor ó igual a  $(r^2)0.98$

3) La ordenada al origen (B) de la relación lineal simple cantidad adicionada - cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero.

4) La pendiente de la relación lineal simple cantidad adicionada - cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a uno  
 $M = 1$

Se elabora la tabla de ANADEVVA de la misma forma que para linealidad del sistema.

Regla de decisión para linealidad

si  $F_{cal} > F_{crit}$  Existe una relación altamente significativa entre "X" y "Y"

EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN

Se evalua de la misma manera que para linealidad del sistema

EVALUACION DE LA PENDIENTE.

considerando las fórmulas presentes a continuación

$$S_m = S_{y/x} \left[ \frac{1}{x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]^{\frac{1}{2}}$$

donde:  $S_{y/x}$  = desviación estandar de la regresión

$S_m$  = desviación estandar de la pendiente

Calcular el Intervalo de Confianza para la pendiente

IC (M) por medio de la siguiente ecuación

$$IC(M) = m \pm t_{n-2, 0.975} (S_m)$$

Determinar en la tabla de distribución "t" de Student el valor para  $t(n-2, 0.975)$

## E). EXACTITUD AL 100%

## Definición:

Exactitud: De un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia

## Determinación.

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

## Criterio.

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

El coeficiente de variación debe ser menor al 2.0%

## EVALUACION:

Empleando la relación que a continuación se presenta

$$S = \left[ \frac{n(\sum y^2) - (\sum Y)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

$$t \text{ calculada} = \frac{\bar{Y} - M}{S_y} \cdot \frac{1}{(n)^{1/2}}$$

donde:  $S_y = S =$  desviación estandar del % recuperado



$M = \mu$  de recobro teorico (100%)

Regla de decisión:

si  $|t \text{ calculada}| < t \text{ crit } (n-1, 0.975)$  no se rechaza y por lo tanto el método de medición tiene una exactitud con un 100%

Intervalo de confianza del % recuperado (IC)

$$IC(M) = \bar{Y} \pm t_{n-1, 0.975} \left( \frac{s}{n} \right)^{1/2}$$

#### P) PRECISION DEL METODO

Es una medida del grado de concordancia relativa entre mediciones repetidas independientes, de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (repetibilidad) o/y bajo diferentes condiciones (reproducibilidad).

a) Repetibilidad: es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas por un solo analista, usando los mismos aparato y técnicas.

b) Reproducibilidad: es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes equipos.

El método se realiza con diferentes analistas y en diferentes días guardando una relación analista - día

Se evalúa reproducibilidad, repetibilidad y precisión mediante el análisis de varianza considerando la siguiente tabla

TABLA DE ANADEVIA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Analista	a - 1	$SCa = \frac{\sum y_{i..}^2}{(d)(r)} - \frac{Y^2}{(a)(d)(r)}$	$MCa = \frac{SCa}{GLa}$	$Fa = \frac{MCa}{MCE}$
Día (dj(i))	$GLd = a[d-1]$	$SCd = \frac{\sum y_{.ij}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{(d)(r)}$	$MCd = \frac{SCd}{GLd}$	$Fd = \frac{MCd}{MCE}$
Error K(ij)	$= ad(r-1)$	$SCE = \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum y_{ij.}^2}{r}$	$MCE = \frac{SCE}{GLE}$	

donde r = número de repeticiones

d = número de días

a = número de analistas

Regla de decisión

si  $F_{cal} > F_{GLE, GLd; 0.05}$

El método analítico no es reproducible por los analistas

si $F_a \text{ cal} < F_{gla, gl; 0.05}$	El método analítico es reproducibile por los analistas
si $F_d > = F_{gld, gl; 0.05}$	El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista
si $F_d < F_{gld, gl; 0.05}$	El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista

Coefficiente de variación total

$$\bar{Y} = \frac{Y_{...}}{n} \quad \text{donde: } n = \text{adr}$$

$$S = \left[ \frac{n \sum \sum Y_{ijk}^2 - (Y_{...})^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{Y}} (100)$$

Criterio de decisión:

Si el método de medición es reproducible y repetible se considera que el método es preciso

### G) TOLERANCIA ANALITICA

**Definición:** Son las condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado

La determinación de la tolerancia de la muestra se efectúa para proporcionar una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos después de un determinado tiempo de haber preparado las muestras, esto es, el tener la certeza de que las muestras preparadas no sufrirán descomposición antes de que sean cuantificadas.

Se almacenan muestras, previamente analizadas en diferentes condiciones por ejemplo, temperatura ambiente, refrigeración, obscuridad, luz blanca .

Se realizan en el tiempo especificado dependiendo del criterio del analista.

Se evalua utilizando el modelo probabilistico " t " de Dunnet

#### EVALUACION:

Se consideran las siguientes fórmulas

$$|t_d \text{ calculada}| = \frac{(Y_i/r) - 100}{[MGe(2/r)]^{1/2}}$$

$$MGe = \frac{SCe}{GLE} = \frac{SCe}{t(r-1)}$$

$$SCe = \left[ \sum \sum Y_{ij}^2 - \frac{\sum Y_i^2}{r} \right]$$

donde  $\bar{Y}_i/r$  = Media del valor de todas las soluciones

t = número de tratamientos

r = número de replicaciones

Determinar en la tabla de distribución "t" de Dunnett el valor de t crítica ( $t_{gle, m; 0.05}$ )

Establecer la decisión, con base a la siguiente regla

si  $|t_{dcal}| \geq t_{gle, m, 0.05}$  La muestra es inestable

si  $|t_{dcal}| < t_{gle, m, 0.05}$  La muestra es estable

Nota: El símbolo  $| |$ , significa valor absoluto.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL.

En este estudio se analizó una solución oftálmica que contiene 21-fosfato de dexametasona sódica y Clorhidrato de Fenilefrina .

#### FORMULA

21-fosfato de Dexametasona Sódica ... 100 mg  
 Clorhidrato de Fenilefrina ..... 120 mg  
 Vehículo c.b.p. .... 100 ml

El análisis de ambos principios activos se realizó mediante espectrofotometría visible

La validación del método analítico para este producto consistió en determinar los siguientes puntos.

**ESPECIFICIDAD:** Se efectuó mediante un barrido espectrofotométrico utilizando muestras de placebo (Excipientes y 21-fosfato de dexametasona sódica o clorhidrato de fenilefrina) estándares de referencia de cada fármaco y la formulación completa tratados de la misma manera.

**LINEALIDAD DEL SISTEMA:** Se llevó a cabo mediante la realización del análisis por triplicado tomando diluciones de una solución de referencia en concentraciones de 75%, 100%, 125% considerando como el 100% el valor esperado.

**PRECISION DEL SISTEMA:** Se realizó con 6 muestras partiendo de una solución de referencia a una concentración del 100% del nivel normal del procedimiento.

**LINEALIDAD DEL METODO:** Se realizó con muestras a concentraciones de 81.14, 100 y 120% para 21-fosfato de Dexametasona Sódica y para el Clorhidrato de Fenilefrina concentraciones de 85, 100 y 120% realizando cada una de las pesadas por triplicado.

**EXACTITUD DEL METODO:** Se realizaron 6 análisis diferentes a la concentración de 100%

**PRECISION DEL METODO:** Se realizó con muestras al 100% de un lote de fabricación, con 2 analistas y en 2 días distintos es decir se guardó una relación analista/día.

**TOLERANCIA;**

**ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA:** Se analizaron 3 muestras de un lote de fabricación, mantenidas en refrigeración, a temperatura ambiente y en la obscuridad durante 24 y 72 horas.

### 3.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### Para 21-fosfato de Dexametasona Sódica

Hidroxido de Sodio 1:250

Azul de Tetrazolium

Hidroxido de Tetrametilamonio

Solución de Fosfatasa Alcalina

Cloroformo R.A.

Cloruro de metileno R.A.

Metanol R.A.

#### Para Clorhidrato de Fenilefrina

Solución de 4-aminoantipirina al 3%

Solución de Ferricianuro de Potasio al 4%

Solución de Tetraborato de Sodio al 5%

### 3.2. METODO ANALITICO PARA DEXAMETASONA 21-FOSFATO SODICO

#### Solución de Referencia

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Dexametasona 21-fosfato sódico S.ref. (Equivalente a 15.2 mg de dexametasona base) y transferirla a un metraz volumétrico de 50 ml disolver con un ml de solución de hidroxido de sodio (1:250) y llevar al volúmen con agua destilada.



#### Solución de Cloruro de Magnesio 0.1M

En un matraz volumétrico de 1000 ml disolver 20.5 g de cloruro de magnesio con agua destilada, aforar con el mismo solvente y mezclar.

#### Solución de Fosfatasa Alcalina.

Pesar 95 mg  $\pm$  5 de la enzima Fosfatasa Alcalina colocarla cuidadosamente a un matraz volumétrico de 50 ml disolver con solución reguladora pH 9 con magnesio y llevar a volumen con la misma solución reguladora, homogenizar.

#### Solución de Hidróxido de Sodio 1:250

Pesar aproximadamente 1.0 g de hidróxido de sodio transferirlo a un matraz volumétrico de 250 ml disolver con agua destilada llevar al volumen y mezclar.

#### Solución de Azul de Tetrazolio.

Pesar exactamente alrededor de 0.5 g de azul de tetrazolio transferirlo a un matraz volumétrico de 100 ml disolver y llevar a volumen con metanol.

#### Solución de la Muestra.

Medir una alícuota de 10 ml de la muestra (solución oftálmica), y colocarlos cuidadosamente a un matraz volumétrico de 25 ml llevar a volumen con agua destilada.

De la solución anterior transferir 10 ml a un embudo de separación lavar enérgicamente con 25 ml de cloruro de metileno y desechar la fase de cloruro de metileno.

#### Solución Reguladora pH 9 con Magnesio.

Mezclar 3.1 g de ácido bórico y 500 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de un litro; adicionar 21 ml de hidróxido de sodio 1N y 10 ml de cloruro de magnesio 0.1M, aforar con agua destilada.

#### Solución 1N de Hidróxido de Sodio.

Pesar aproximadamente 40 g de hidróxido de sodio y colocarlos cuidadosamente a un vaso de precipitados de 150 ml, disolver las lentejas con ayuda de pequeñas cantidades de agua destilada; transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 ml aforar con el mismo solvente, mezclar.

### Solución de Hidróxido de Tetrametilamonio.

Mezclar 10 ml de una solución al 10% de Hidróxido de Tetrametilamonio con 90 ml de metanol.

### Blanco de Reactivos

Medir 10 ml de cloroformo y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml.

### Procedimiento:

Transferir 2 ml de la solución de referencia y de la muestra a dos matraces volumétricos de 10 ml respectivamente, Adicionar a cada uno de los matraces 5 ml de la solución de fosfatasa alcalina, taparlos y colocarlos en una estufa a 37°C por 45 minutos. Realizar una extracción vigorosa con 25 ml de cloroformo en un embudo de separación.

Depositar la capa clorofórmica en matraces volumétricos de 25 ml aforar con el mismo solvente y homogenizar.

Transferir una alícuota de 10 ml por separado, en matraces volumétricos de 25 ml de la solución de referencia y de la muestra. En otro matraz volumétrico de 25 ml adicionar 10 ml de cloroformo y etiquetarlo como blanco.

Adicionar 2 ml de la solución de azul de tetrazolio 2 ml de la solución de hidróxido de tetrametilamonio, en el siguiente orden blanco de reactivos, solución de referencia y muestra, llevar a volumen con cloroformo, mezclar y dejarlos reposar por un

tiempo de 45 minutos hasta que se desarrolle el color.

Pasado este tiempo determinar la absorbencia de cada uno de los matraces en un espectrofotómetro adecuado en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorbencia, de 525 nm empleando el blanco de reactivos como blanco de ajuste.

La concentración de esta solución es de 12.8  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.3. METODO ANALITICO PARA CLORHIDRATO DE FENILEFRINA

Solución de 4-Aminoantipirina al 3%

Pesar exactamente alrededor de 3 g de 4-aminoantipirina y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml disolver y aforar con agua destilada

Solución de Ferricianuro de Potasio al 4%

Pesar 4 g de ferricianuro de potasio, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml disolver y aforar con agua destilada

Solución de Tetraborato de Sodio al 5%

Pesar aproximadamente 25 g de tetraborato de sodio y transferirlos a un matraz volumétrico de 500 ml; disolver con ayuda de pequeñas cantidades de agua caliente y agitación continua, enfriar, llevar a volumen con agua destilada y mezclar.

### Solución de Referencia.

Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Clorhidrato de Fenilefrina transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml; disolver y aforar con agua destilada, mezclar.

### Solución de la Muestra.

Tomar una alícuota de 2 ml de la muestra (solución oftálmica) (equivalente a 2.4 mg de clorhidrato de fenilefrina), transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml; llevar al volumen con agua destilada y mezclar.

### Blanco de Reactivos.

Colocar 4 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 50 ml el cual contiene aproximadamente 40 ml de borato de sodio

### Procedimiento.

Transferir 4 ml de la solución de referencia y de la muestra a matraces de 50 ml respectivamente, los cuales contienen aproximadamente 40 ml de tetraborato de sodio al 5%.

A cada uno de los matraces y en el siguiente orden, blanco de reactivos, solución de referencia y muestra adicionar 1 ml de ferricianuro de potasio al 4% y 1 ml de 4-aminoantipirina al 2% aforar con tetraborato de sodio al 5% y homogenizar.

Inmediatamente determinar la absorbancia de cada matraz en un espectrofotómetro adecuado, a la longitud de onda de máxima absorbancia, de 490 nm empleando el blanco de reactivos como blanco de ajuste.

## 3.4. RESULTADOS DE LA VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS

## ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA 21-FOSFATO DE DEXAMETASONA SODICA

Se determinó la especificidad del método determinándose la absorbancia de los principios activos y placebo a la longitud de onda a la que se determina la Dexametasona 21-fosfato Sódico en el método propuesto a una longitud de onda de 525 nm de acuerdo al siguiente esquema.

	Abs	nm
Placebo + Clorh Fenilefrina + Dexamet 21-fosfato Sódico	0.515	525
Placebo + Dexametasona 21-fosfato Sódico Substancia Ref.	0.514	525
Placebo + Clorhidrato de Fenilefrina	- 0.008	525

## ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA CLORHIDRATO DE FENILEFRINA

	Abs	nm
Placebo + Clorh Fenilefrina + Dexamet 21-fosfato Sódico	0.499	490
Placebo + Clorhidrato de Fenilefrina Substancia Ref.	0.498	490
Placebo + Dexametasona 21-fosfato Sódico	0.003	490

## EVALUACION

Para 21-fosfato de Dexametasona Sódica

Analizando las absorbancias se observa que a la longitud de

onda de máxima absorción (525 nm) no existe interferencia por parte del placebo (Excipiente y Clorhidrato de Fenilefrina)

Para Clorhidrato de Fenilefrina.

Se observa que en la longitud de onda de máxima absorción (490 nm), no existe interferencia por parte del placebo (Excipientes y Dexametasona 21-fosfato de Dexametasona Sódica). Por consiguiente el método experimentado es específico.

## LINEALIDAD DEL SISTEMA.

La siguiente tabla contiene los resultados de las lecturas espectrofotométricas en la prueba de linealidad.

Tabla 1

Concentración final ( $\mu\text{g/ml}$ )		Absorbancias	
Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dexta metasona sodica	Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dexta metasona sodica
5.92	9.6	0.368	0.4076
5.92	9.6	0.355	0.4023
5.92	9.6	0.370	0.4046
8.0	12.8	0.504	0.5365
8.0	12.8	0.501	0.5385
8.0	12.8	0.503	0.5403
10.08	16.0	0.635	0.6853
10.08	16.0	0.640	0.6726
10.08	16.0	0.636	0.6886

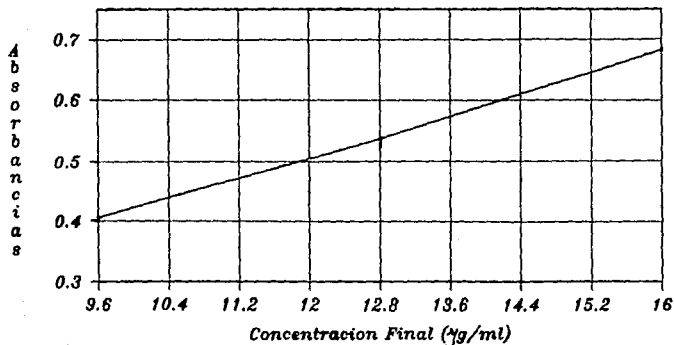
## EVALUACION DE LINEALIDAD.

Análisis de varianza

Tabla 2

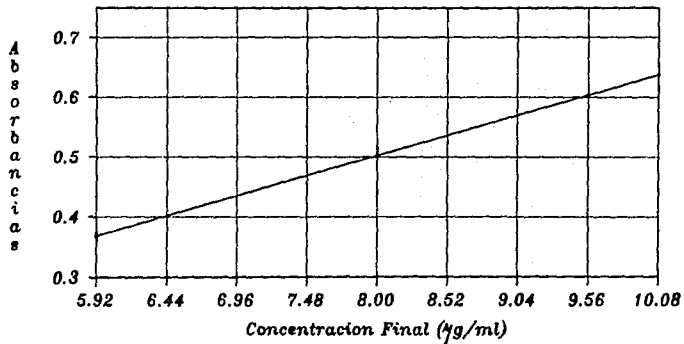
	21-fosfato dexta metasona sodica	Clorhidrato de fenilefrina
m	0.04333	0.064743
b	- 0.0128	- 0.015504
$r^2$	0.999	0.9999
r	0.9981	0.9998





*21-Fosfato de Dexametasona Sodica*

*Grafica No. 1*



*Fenilefrina Clorhidrato*

*Grafica No. 2*

Tabla de Anadeva para 21-fosfato de dexametasona sódica  
Tabla 3

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
r	1	0.115125	0.115125	2151.3359
er	7	$3.745 \times 10^{-4}$	$5.35 \times 10^{-5}$	

Tabla de Anadeva para Clorhidrato de Fenilefrina

Tabla 4

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
r	1	0.107303	0.107303	14374.4
er	7	$5.27 \times 10^{-5}$	$7.5 \times 10^{-6}$	

Ya que  $F_{calculada} > F_{crit}$

2151.3359 y 14374.4 > 12.25 ; Existe una relación altamente significativa entre X y Y el Sistema es lineal

Evaluación del intervalo de confianza para la ordenada al origen.

$t_{crit} 7; 0.975 = 2.262$

$IC(B) = b \pm t_{n-2, 0.975} (S_b)$

Para 21-fosfato de dexametasona sodica

- O. 03379 (B) O.00815

Para Clorhidrato de Fenilefrina

- O.01761 (B) O.013395

PRECISION DEL SISTEMA:

A continuación se presentan los datos de absorbancia de los diferentes soluciones para calcular la precisión del sistema de 21-fosfato de dexametasona sodica y Clorhidrato de fenilefrina

Tabla 5

Concentración final ( Mg/ml )		Absorbencias	
Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dexta metasona sodica	Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dexta metasona sodica
8.0	12.8	0.5035	0.5365
8.0	12.8	0.5045	0.5335
8.0	12.8	0.5030	0.5403
8.0	12.8	0.5015	0.5287
8.0	12.8	0.5020	0.5383
8.0	12.8	0.5030	0.5390

## EVALUACION

Tabla 6.

	21-fosfato de dexametasona sodica	Clorhidrato de fenilefrina
n	6	6
$\sum Y$	3.2213	3.01754
$\sum Y^2$	1.729549	1.5175569
$\bar{Y}$	0.5369	0.5029
$S_y$	0.0042	0.00108
CV	0.78%	0.21%

Como 0.78% y 0.21% son menores que 1.5% por lo tanto el sistema es preciso para ambos principios activos

## LINEALIDAD DEL METODO.

Las siguientes tablas presentan la cantidad recuperada de cada principio activo, considerando en la cantidad adicionada la potencia de los fármacos ajustado al 100%

Tabla 7

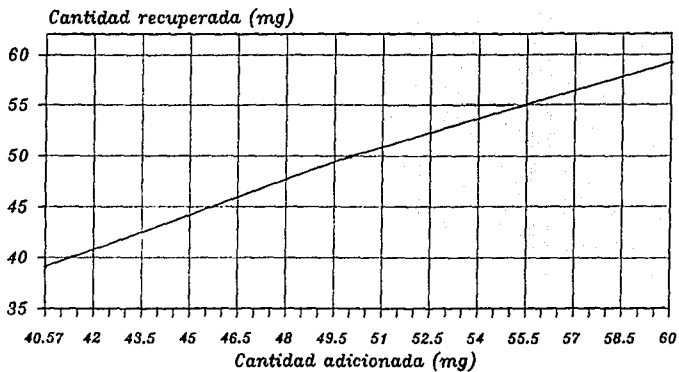
Cantidad Adicionada (mg)		Cantidad recuperada (mg)	
Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dexta metasona sodica	Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dexta metasona sodica
25.5	40.57	25.104	38.87
25.5	40.57	24.93	39.45
25.5	40.57	25.047	39.87
30.0	50.0	29.94	50.0
30.0	50.0	30.057	49.95
30.0	50.0	30.057	49.95
36.0	60.0	35.883	59.86
36.0	60.0	35.823	59.91
36.0	60.0	35.94	57.93

## EVALUACION DE LINEALIDAD

## Análisis de varianza

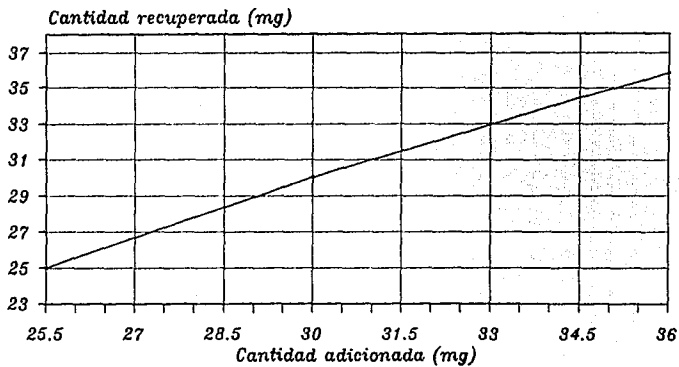
Tabla 8

	Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dexta metasona sodica
m	1.03076	1.0369
b	- 1.12908	- 2.6241
r	0.999266	0.995712
r <sup>2</sup>	0.9935	0.9914
S <sub>y/x</sub>	0.18204	0.9803311
CV	0.60061	1.9836



*21-Fosfato de Dexametasona Sodica*

*Grafica No. 3*



*Fenilefrina Clorhidrato*

*Grafica No. 4*



Tabla de Anadeva para de 21-fosfato de dexmetasona sodica

Tabla 9

FV	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
r	1	607.6305	607.6305	632.2575
er	7	6.727344	0.961049	

Tabla de Anadeva para Clorhidrato de fenilefrina

Tabla 10

FV	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
r	1	176.92735	176.92735	5333.9465
er	7	0.231971	0.033139	

Para Linealidad.

$$F_{crit} = (0.01, 1, 7) = 12.25$$

$F_{calculada} > F_{crit}$  632.2575 y 5333.9465 > 12.25 por lo tanto existe una relación altamente significativa entre " X " y " Y "

## Evaluación del Intervalo de Confianza para la ordenada al origen

$$IC(B) = b \pm t_{n-2, 0.975}(Sb)$$

En donde  $t_{7, 0.975} = 2.3646$

Para 21-fosfato de dexametasona sodica

$$-7.59042 (B)$$

Para Clorhidrato de fenilefrina

$$-0.010155 (B) \quad 2.156607 \quad \text{En donde el IC para B incluye el cero 0.0}$$

## Evaluación del Intervalo de Confianza para la Pendiente

$$IC(M) = m \pm t_{n-2, 0.975}(Sm)$$

Para 21-fosfato de dexametasona sodica

$$0.9395 (M) \quad 1.13429$$

Para Clorhidrato de fenilefrina

$$0.9974 (M) \quad 1.0641 \quad \text{En donde el IC para M se incluye el uno 1.0}$$

## EXACTITUD DEL METODO AL 100%

El por ciento de recobro para las determinaciones de 21-fosfato de dexametasona sodica y Clorhidrato de fenilefrina se reporta en la siguiente tabla.

Para 21-fosfato de dexametasona sódica.

Tabla 11

Cantidad (mg) Adicionada	Absorción	Cantidad (mg) Recuperada	% de Recobro
50	0.525	51.07	102.14
50	0.517	50.14	100.58
50	0.514	50.0	100.0
50	0.515	50.09	100.19
50	0.514	50.0	100.0
50	0.515	50.09	100.19

Para Clorhidrato de fenilefrina.

Tabla 12

Cantidad (mg) Adicionada	Absorcion	Cantidad (mg) Recuperada	% de Recobro
30.0	0.500	30.12	100.401
30.0	0.495	29.82	99.397
30.0	0.500	30.12	100.401
30.0	0.496	29.88	99.598
30.0	0.503	30.30	101.004
30.0	0.502	30.24	100.803

EVALUACION.

Tabla 13

	Clorhidrato fenilefrina	21-fosfato dextro metasona sodica
n	6	6
$\bar{y}$	100.52	100.267
$S_y$	0.82	0.6434
tcal	0.2588	0.17196

CV = 0.82% y 0.64%      2.0%

Intervalo de Confianza del % Recuperado (IC)

$$IC(M) = \bar{Y} \pm t_{n-1, 0.975} \left( \frac{S}{\sqrt{n}} / 2 \right)$$

$$t_{crit}(5, 0.975) = 2.5706$$

Para 21-fosfato de dexametasona sodica

$$99.653(M) \quad 101.3804$$

Para Clorhidrato de fenilefrina

$$99.5924 (M) \quad 100.943$$

Criterio de Aceptación.

$$CV < 2.0\%$$

$$t \text{ calculada} < t \text{ crit}$$

El IC debe incluir el 100%

Por lo tanto el método es exacto

## PRECISION DEL METODO.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de 21-fosfato de dexametasona sodica y Clorhidrato de fenilefrina por dos analisis y en dos dias diferentes se muestran en las tables siguientes.

Para 21-fosfato de dexametasona sodica.

Tabla 14

		Analista (i)	
		% de Recobro	
		1	2
D	1	100.1418	103.9188
		102.5625	99.0492
I		99.7657	100.999
	A		
j(i)		96.751	98.6471
	2	97.6647	101.2439
		98.3993	100.8765

Para Clorhidrato de fenilefrina.

Tabla 15

		Analista (i) % de Recobro	
		1	2
D I A	1	100.4496	100.0474
		101.0258	99.8583
		101.0258	99.1017
j(i)	2	100.8728	98.4332
		100.6811	98.8170
		100.2975	99.2007

Análisis de Varianza.

Tabla de Anadeva para 21-fosfato de dexametasona sodica

Tabla 16

FV	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Analista	1	7.4421	7.4421	0.8633
Dia	2	17.2407	8.6204	3.144
Error	8	21.9357	2.74196	

Tabla de Anadeva para Clorhidrato de fenilefrina.

Tabla 17

FV	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Analista	1	6.5924	6.5924	11.37
Dia	2	1.1596	0.5798	3.90
Error	8	1.1884	0.1486	

## EVALUACION DE REPRODUCIBILIDAD.

$$F_{crit}(1, 2; 0.05) = 18.51$$

Como 0.8633 y 11.37 son menores que 18.51 no se rechaza y por consiguiente el método es reproducible por los analistas.

## EVALUACION PARA REPETIBILIDAD.

$$F_{crit}(2, 8; 0.05) = 4.46$$

Como 3.144 y 3.9 son menores que 4.46 por consiguiente el método analítico es reproducible en distintos días por el mismo analista.

## EVALUACION DE PRECISION.

Como el CV 2.06% y 0.9016 son menores que 3.0%. Por consiguiente, para ambos principios activos el método de medición cum-



ple con los parámetros anteriores y por lo tanto el método es preciso.

**TOLERANCIA.**

**ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.**

La cuantificación de 21-fosfato de dexametasona sódica y clorhidrato de fenilefrina despues de mantener las soluciones durante 24 y 72 horas en las condiciones, temperatura ambiente, obscuridad y refrigeración presentarán los siguientes resultados.

Dexametasona 21-fosfato Sódico después de incubación y antes del desarrollo de color.

Clorhidrato de Fenilefrina en medio alcalino y antes del desarrollo de color.

Para 21-fosfato de dexametasona sódica

Resultados iniciales.

Tabla 18

Muestra	% de Recobro
1	103.275
2	103.468
3	104.238
Promedio	103.6603

Resultados despues de 24 y 72 horas

Tabla 19

		Condición		
		% Recobro		
		Temp Ambiente	Oscuridad	Refrigeración
T i e m p	24	95.5390	96.2966	96.6542
		95.5390	97.7693	97.2118
		95.3523	97.7693	97.3950
O hrs	72	94.2984	92.7202	94.6929
		93.3125	92.7202	94.8907
		90.9413	93.5093	94.3907

Para Clorhidrato de fenilefrina.

Resultados iniciales

Tabla 20

Muestra	% de Recobro
1	101.5827
2	102.2110
3	101.5827
Promedio	101.7921

Resultados despues de 24 y 72 horas

Tabla 21

		Condición		
		% Recobro		
		Temp Ambiente	Obscuridad	Refrigeración
T i e n	24	82.1631	99.5478	98.9209
		82.9910	99.1339	98.0990
		34.4397	99.1339	98.3059
p o hrs	72	81.5875	37.5740	33.2533
		79.5350	38.9424	89.1134
		81.4165	38.2583	39.9637

Análisis de Varianza.

Tabla 22

FV	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	
Error	12	0.5823	0.71519	21-fosfato de dexametasona sodio
	12	8.1342	0.67785	Clorhidrato de fenilefrina

Calcular el valor de " t " de Dunnet ( $t_{Dcalc}$ ) para cada combinación Condición-Tiempo con base a la siguiente ecuación

$$|t_{D calc}| = \frac{(Y_i/r) - 100}{(ME)(2/r)^{1/2}}$$

$t_D$  calculada para 21-fosfato de dexametasona sodica

Tabla 23

		Temp Ambiente	Oscuridad	Refrigeración
T hrs	24	7.745	4.776	2.314
	72	12.2429	12.016	8.862

$t_D$  calculada para clorhidrato de fenilefrina.

Tabla 24

		Temp Ambiente	Oscuridad	Refrigeración
T hrs	24	24.992	1.083	2.314
	72	28.489	17.465	16.193

$$t_{D crit 6, 12; 0.05} = 2.98$$

**EVALUACION.**

Para 21-fosfato de dexametasona sodica.

En todos los casos  $t_D$  calculada 2.98 por tanto podemos considerar que la muestra es inestable durante 24 y 72 horas en las condiciones probadas.

Para clorhidrato de fenilefrina.

La muestra es estable durante las primeras 24 horas en refrigeración y en la obscuridad ya que  $t_D$  calculada 2.98

Para los otros casos en las condiciones probadas puesto que  $t_D$  calculada 2.93 la muestra es inestable.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

#### 4. CONCLUSIONES.

En el desarrollo de este trabajo se verificó la Precisión y Exactitud del método para la cuantificación de 21-fosfato de Dexametasona Sódica y Clorhidrato de Fenilefrina en solución oftálmica para ser utilizado en el control de calidad de este producto.

Se adaptaron los métodos de cuantificación propuestos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Quinta Edición para cada principio activo por separado. En relación a la especificidad del método, se observa que no existe interferencia del placebo ni del Clorhidrato de Fenilefrina en el producto en estudio en la cuantificación de 21-fosfato de Dexametasona Sódica, tampoco existe interferencia del placebo ni de 21-fosfato de Dexametasona Sódica en el producto en estudio en la cuantificación de Clorhidrato de Fenilefrina.

En las gráficas 3 y 4 se muestra la tendencia lineal del método en ambos fármacos. Para los dos principios activos se presenta una ordenada al origen igual a cero y una pendiente igual a uno verificando esto mismo con el análisis probabilístico de la tabla de Anadeva en donde el Intervalo de Confianza para la ordenada al origen IC(b) incluye el cero y el Intervalo de Confianza para la pendiente IC(m) incluye el uno.

Los métodos son precisos ya que la CV(coeficiente de variación) calculada para el sistema fue aceptada como se muestra en la tabla No 6, Se considera que el método de medición tiene una Exactitud de 100% como se muestra en la tabla No 13

Los resultados obtenidos en la precisión del método muestran que el método de medición es reproducible y repetible en distintos días por dos analistas.

En la prueba de tolerancia respecto a estabilidad de la muestra analítica para 21-fosfato de Dexametasona Sódica se demostró inestabilidad de la muestra en condiciones de obscuridad, refrigeración y temperatura ambiente en un tiempo de 24 y 72 horas lo que implica que deberá tomarse la lectura espectrofotométrica el mismo día de su prueba o terminar el análisis el mismo día de inicio.

Por lo que respecta a la estabilidad de la muestra analítica para Clorhidrato de Fenilefrina se considera que la muestra es estable durante 24 horas en condiciones de obscuridad, refrigeración y temperatura ambiente.

El método reportado en este trabajo es sencillo y práctico y analizando los resultados obtenidos podemos decir que el método analítico satisface los puntos establecidos en la validación.

Como consecuencia de ello se concluye que dicho método es confiable para el control de calidad del producto terminado.

## 5. BIBLIOGRAFIA.

(1) The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, And Biologicals, Tenth Edition, Merck & CO., Inc U.S.A. (1983). 425,1051

(2) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Quinta Edición, Secretaria de Salud. México (1988) 619, 620, 1213-1216

(3) Florey K., Et Al Analytical Profiles Of Drugs Substances, vol 3 Academic Press Inc U.S.A. (1986) 484-507

(4) The United States Pharmacopeia XXII, The National Formulary XVII (1990), 1070-1071 y 400-401

(5) Willard, H.H., Et Al. Métodos Instrumentales de Análisis Gía. Editorial Continental, S.A. de C.V. México (1984)

(6) Pharmacopeial Forum Current Concepts for The Validation of Compendial Assays The United States Pharmacopeial Convention Inc U.S.A. (1986)

(7) Manual del Curso, Estadística Aplicada a la Validación de Métodos Analíticos, Asociación Farmacéutica Mexicana

(8) Florey K., Et Al Analytical Profiles Of Drugs Substances vol 5 Academic Press Inc, U.S.A 163-197

(9) Berry, I. R Process Validation. Practical Applications to Pharmaceutical Products Drug Dev & Ind. Pharm. 1988, vol 14, num 2 3y 377-89