

11214 2
Rj.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA SOCIAL, MEDICINA PREVENTIVA
Y SALUD PÚBLICA

ESPECIALIZACION EN ESTADISTICA APLICADA A LA SALUD

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRÍA(UV)
PARA LA DETERMINACIÓN DE MELATONINA EN TABLETAS "**

TRABAJO DE FIN DE CURSO PRESENTADO POR

Q.F.B. MARÍA DEL SOCORRO RAMÍREZ GUTIÉRREZ
(GENERACION 1984)

PARA LA OBTENCION DEL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN ESTADISTICA APLICADA A LA SALUD.

DIRECTOR DEL TRABAJO:

DR. JESÚS REYNAGA OBREGON.

LUGAR DE REALIZACION :

Profesional Médica Farcoral S.A. de C.V.
Departamento de Medicina Social, Medicina Preventiva y Salud Pública de la
Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

TESIS CON
SELLA DE ORIGEN

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

En última instancia, la solución de los problemas no consiste en HACER, ni en dejar de HACER, sino en COMPRENDER; porque donde hay verdadera comprensión, no hay problemas.

Anthony de Mello

Con respeto, admiración y mis sinceros
agradecimientos por la valiosa ayuda y
orientación para la realización de este trabajo

al **Dr. Jesús Reynaga Obregon**

Agradezco su tiempo y el apoyo brindado
al H. jurado

Dra. ROSALINA VILLANUEVA CRUZ
Dra. BLANCA ESTELA VARGAZ TÉRREZ
Dr. ELEUTERIO GANZALES CARBAJAL
Dr. PRIMO ANTONIO SANDOVAL
Dr. JESÚS REYNAGA OBREGON

RESUMEN

Normalmente las condiciones de operación en el laboratorio de control analítico, requieren de métodos robustos que puedan realizarse rutinariamente por diferentes químicos sobre diferentes instrumentos, estos elementos son importantes cuando se realiza el desarrollo de métodos químicos analíticos a ser viables y asegurar la calidad y manufactura de formas farmacéuticas establecidas y a diseñar. La implementación de un método analítico estará sujeto a variaciones, por lo que es necesario validarlo.

En el diseño y manufactura de nuevos fármacos tiene especial importancia terapéutica la Melatonina cuya fabricación no sólo esta confinada a la glándula pineal, también se puede producir sintéticamente y llevarla a la industria farmacéutica para su manufactura como medicamento. Numerosos estudios clínicos indican que su acción terapéutica es la inducción de sueño en humanos; además muchas investigaciones se han centrado en los posibles efectos sobre la pubertad y desarrollo, inhibición ovulatoria, sistema endocrino, estado psiquiátrico, enfermedades inmunitarias y los más estudiados sobre el ajuste de el desequilibrio en el ciclo circadiano sueño vigilia producido por un cambio de fase forzado (horario de trabajo o cambios de uso horario en viajes intercontinentales)

La calidad en la fabricación de tabletas de Melatonina forma parte el control analítico de su valoración química. Por lo tanto el desarrollo del método analítico debe ser validado, procedimiento con el cual se logra la calidad, seguridad y efectividad especificada para el método analítico.

Se desarrolló un método analítico por espectrofotometría en la región uv, realizando una validación prospectiva determinando su especificidad, exactitud, precisión, linealidad y tolerancia.

En base a las necesidades y requerimientos del laboratorio se logró implementar un método que resultó sencillo, sensible y específico, rápido, confiable y con un considerable ahorro respecto a otras metodologías analíticas , asimismo, ofrece un bajo consumo tanto en reactivos como en tiempo, lo que significa menor riesgo para el analista, y mayor rapidez en los análisis .

Dado que el método cumplió con el parámetro de linealidad en el intervalo de 80-120 %, además de ser exacto y preciso, se considero como una metodología que sirve para la cuantificación confiable de Melatonina en el análisis del control de calidad .

INDICE

	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
II.1 FARMACOLOGIA DE MELATONINA	3
II.2 VALIDACIÓN	10
II.2.1 DEFINICIONES EMPLEADAS EN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	15
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. OBJETIVO	19
V. METODOLOGÍA ANALÍTICA	20
VI. RESULTADOS	28
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. ANEXO 1	50
X. ANEXO 2	55
XI. BIBLIOGRAFÍA	66

I. INTRODUCCIÓN

Toda acción que se repite dos ó más veces estará sujeta a un fenómeno conocido como "variación " ya que es muy difícil que un mismo resultado de la acción en cuestión se reproduzca con la misma magnitud dos veces seguidas pues estará sujeto a un gran número de factores que provoca que no se den las mismas condiciones de la primera vez.

Afortunadamente existen procedimientos que nos permiten evaluar la variación de un fenómeno ya que es reconocido que existe un comportamiento regular de la variación de un fenómeno cuando se reproduce en condiciones similares. A este comportamiento de le conoce como Regularidad Estadística, representada matemáticamente como una función de probabilidad. De tal forma que durante un proceso de validación se trata de conocer el comportamiento de esta variación de causas asignables de aquellas causas debidas al azar.

Existen una diversidad de definiciones para el concepto de validación y todas ellas son operantes debido a que manejan el mismo concepto, entre estas podemos mencionar:

- a) La validación es una forma de comprobar la efectividad y reproducibilidad de una técnica, operación o proceso .
- b) Se dice que un proceso, técnica u operación está validado cuando se tiene bajo control .
- c) Procedimiento mediante el cual se documentan pruebas de que un proceso de fabricación ó un método de análisis rinden lo que de ellos se espera o requiere.
- d) Comprobar a través de un procedimiento formal y documentado que en condiciones preestablecidas con todos los parámetros significativos bajo control, se obtiene un producto con calidad diseñada, verificando en forma documentada la confiabilidad de las técnicas analíticas y procesos de manufactura.

Son varias las razones por lo que la validación es importante ; por mencionar algunas, tenemos que :

1. Por ética profesional .- Tenemos el compromiso moral de fabricar productos de calidad , pues en nuestras manos esta la salud de muchos .
2. Para reducir costos .- Por que el validar es asegurar la calidad a un costo más bajo .
3. Por principio de Aseguramiento de Calidad .- Cada paso del proceso de manufactura debe estar bajo control , para tener la máxima probabilidad de que el producto terminado cumpla con todas las especificaciones de calidad y diseño .

4. Para establecer una Regulación Sanitaria: al respecto en los Estados Unidos el gobierno exige que todos los procesos farmacéuticos sean validados . Un requerimiento similar existe en otros países y ahora en México se empieza a oficializar dichos principios y esto dio origen a la creación de un Comité que se ha encargado de redactar Guías Generales de Validación .

Los parámetros de calidad son físicos, biológicos y químicos , aplicándose en estos últimos los numerosos métodos analíticos, incluyéndose desde los métodos clásicos como el gravimétrico , volumétrico, colorimétrico, hasta la instrumentación más sofisticada de gran precisión y sensibilidad como la cromatografía de líquidos y gases ²⁰. La elección del método está en función de las propiedades de la sustancia de interés; pero también es determinante su accesibilidad económica ¹⁹ . Por lo que la cuantificación de los analitos en estudio requieren no sólo de la validación de métodos farmacopéicos ,sino también de métodos alternativos, que sufren modificaciones necesarias propias del laboratorio. De ahí que este trabajo de validación de un método analítico tiene el propósito de establecer a través de una evidencia documentada su confiabilidad en base a la evaluación de : precisión , linealidad , exactitud , especificidad , estabilidad y tolerancia , parámetros reconocidos a nivel nacional e internacional .

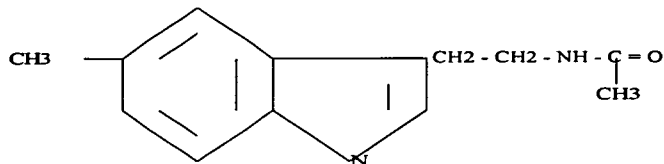
II .GENERALIDADES

III.1.1. MONOGRAFÍA DE LA MELATONINA ^{6,15,16,22,23,25,26,31}

NOMBRES QUÍMICOS

N-acetyl-5-methoxytryptamine.
N-acetyl-O-methyl serotonina

FORMULA DESARROLLADA



FORMULA MOLECULAR

$C_{13} H_{16} N_2 O_2$

PESO MOLECULAR

232.3

ASPECTO

Polvo blanco cristalino, libre de partículas extrañas .

SOLUBILIDAD :

Insoluble en agua, soluble en etanol, ligeramente soluble en propilenglicol, prácticamente insoluble en acetona y cloroformo .

ENSAYO DE IDENTIDAD :

A. MGA 0351 . El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio , exhibe máximo a la misma longitud de onda que una preparación similar de la Sref de Melatonina .

B. MGA 0361 El espectrofotómetro en la región UV debe dar máximos y mínimos que un Std de referencia .

C. MGA 0241 (capa delgada) La mancha con un R.f. aproximado 0.87 debe corresponder en tamaño , color y R.f. a la mancha obtenida en el cromatograma de un std. de referencia .

TEMPERATURA DE FUSIÓN :

MGA 0471 Entre 116-118 °C

pH

MGA 0701 Entre 5-7 50 mg/mL en agua destilada .

SUSTANCIAS RELACIONADAS .

MGA 0241 (capa delgada) Observar el cromatograma obtenido en el ensayo de identidad C la mancha obtenida en el cromatograma con la preparación de la muestra , con un Rf aproximado a 0.87 y que sea diferente de la mancha principal, no debe ser mas grande ni más intensa, que la mancha obtenida en el cromatograma con la preparación II de referencia, lo que equivale a no mas de 2 % de sustancias relacionadas .

PERDIDA POR SECADO

MGA 0671 No más del 1 % . Secar a 105 °C durante 2 horas .

VALORACIÓN

Valoración potenciométrica con ácido perclórico :

Pesar con exactitud aproximadamente 50 - 100 mg de sustancia y disolver en 40 mL de ácido acético glacial y 40 mL de anhídrido acético, mas 10 mL de acetato mercurico. Valorar con solución 0.1 N de ácido perclórico (en ácido acético glacial). Preparar un blanco de determinación y hacer la corrección necesaria . Cada mL de solución de 0.1 N de ácido perclórico es equivalente a 23.23 mg de Melatonina .

Cálculos :

La relación usada es :

$$\% \text{ de MELATONINA} = (x-y) * F * 23.23 * 100 / \text{peso de la muestra (mg)}$$

Donde :

x = consumo de la prueba (mL)

y = consumo de la prueba en blanco

F= factor de la solución de ácido perclórico

11.1.2 FARMACOLOGÍA

La capacidad de la melatonina para facilitar el sueño fue notada por primera vez en animales poco después de su aislamiento e identificación⁴⁰, los primeros estudios en humanos también sugirieron un posible papel de la melatonina en la regulación del inicio de sueño¹.

Aunque la administración exógena de melatonina afecta el dormir y produce somnolencia, no se sabe aún con certeza si la secreción endógena de melatonina por la glándula pineal altera el sueño en humanos.⁵⁰ Algunos estudios demostraron que el patrón normal de secreción de melatonina está elevado en individuos que cambian su horario de trabajo y que su ritmo endógeno de secreción de melatonina depende de su patrón diario de actividad,⁶⁴ además se reporta una covariación circadiana de fatiga y melatonina urinaria, y sugirieron que la melatonina está involucrada en la regulación del ciclo vigilia sueño.²

Armstrong et al. 1986 han reportado efectos benéficos de la melatonina sobre viajes intercontinentales (jet-lag) en la latencia y calidad del sueño.⁶ Arden y col.⁷ reportaron que dosis de melatonina administradas en horarios apropiados aceleran el ajuste de un desequilibrio en el ciclo circadiano sueño-vigilia producido por un cambio de fase forzado (sheff-work).

Los estudios científicos realizados a la fecha señalan que la melatonina se puede considerar como un excelente marcador del ritmo circadiano, lo cual indica que ejerce un papel importante en el sistema central generador ritmos.⁷ Por otro lado se han observado efectos significativos en el estado de ánimo, algunos reportes preliminares indican que la melatonina inhibe la ovulación¹⁴ por lo que puede presentar un posible efecto sobre ciclo ovulatorio¹³, otras observaciones relacionado con el sistema endocrino, dosis agudas ni crónicas de melatonina tuvieron efecto sobre las hormonas GH, LH, FSH, T4, testosterona y cortisol¹². Estudios realizados por Tamarin sobre la pinealectomía en ratas se presentó un incremento de tumores malignos en los ovarios y glándulas mamarias, estos tumores decrecieron dramáticamente cuando se les administró melatonina.¹⁰

Más recientemente, la neurohormona melatonina ha mostrado tener un efecto restaurador sobre la función del timo induciendo un crecimiento en la glándula y recobrando la eficiencia inmunológica periférica.⁴⁹

En estudios realizados por MacFarlane y cols.³⁹ determinaron los niveles séricos de melatonina por radioinmunoensayo y se encontró que la melatonina se absorbe rápidamente tras la administración oral, y se observó que alcanza los niveles picos en 90 minutos tras una dosis de 2.3 mg. fue de 2630 pg/mL y una dosis de 75 mg los niveles se elevaron hasta 64,730 pg/mL (niveles fisiológicos normales 60-80 pg/mL), después de la administración de 2.5 mg los niveles de melatonina retornaron a niveles fisiológicos en 7 horas y de 75 mg el nivel plasmático se mantuvo en 298 pg/ml a las 9 horas, por lo que la vida media de la melatonina en dosis de 2.5 mg se estimó ser de 7 horas.

Otras investigaciones realizadas en sujetos ancianos (69 a 93 años), con problemas de insomnio²³ se les administró melatonina por liberación controlada, para mantener las concentraciones séricas efectivas durante toda la noche los valores absolutos de pico máximo de secreción fueron bajas (0.93 mcg/ hora) comparados con los ancianos sanos (3.7 mcg/hora).

Según Ardent, la vida media que posee es una vida media de 40 a 50 min., las concentraciones alcanzan su pico máximo en 20 minutos, después de la administración oral y caen rápidamente a medida que avanza la noche “

La síntesis de la melatonina no sólo se realiza en la glándula pineal, al parecer también se produce en la retina,¹⁴ en las glándulas Harderianas,²¹ sin embargo parece ser que estos órganos no influyen en los niveles sanguíneos de la melatonina,⁴ también se han reportado estudios de producción de melatonina en el tracto gastrointestinal, en el SNC y en los eritrocitos.

La ruta metabólica de la síntesis de la melatonina en el organismo está bien estudiada.⁴ El aminoácido triptófano es formado desde la circulación hacia la glándula pineal, se cree que sea por un mecanismo de transporte activo. La recaptura del triptófano hacia el melanocito está bajo control de receptores noradrenérgicos, pero al parecer no se involucra al AMP cíclico.⁷ La administración de triptófano incrementa las concentraciones de serotonina en la glándula pineal.⁶

Este incremento de serotonina depende del momento luz-obscuridad, en el cual se haya administrado el triptófano.¹⁴ Después de su entrada al pinealocito, el triptófano es hidroxilado para formar 5-hidroxitriptófano, conversión que depende de la enzima triptofanhidrolasa (TH).

La actividad de esta enzima es regulada por receptores beta adrenérgicos.²³ Al parecer en alguna especie, la actividad de la TH pineal se incrementa durante la noche. Después de la formación del 5-hidroxitriptófano (5HT), éste es descarboxilado por la enzima 5 HTP descarboxilasa lo que resulta es la producción de serotonina (5 HT),³⁸ En general la actividad de esta enzima es muy alta en tejido pineal pero no parece observar un nivel de actividad cambiante con el ciclo luz-obscuridad.⁴⁰ La serotonina sigue varias vías de metabolismo, una de ellas es la acetilación por la enzima N-acetil-transferasa (NAT) para producir N-acetil serotonina, el precursor inmediato de la melatonina⁴². Fue demostrado por primera vez en 1970 que la actividad de la NAT muestra un ciclo de 24 horas, en la glándula pineal.³⁵ Este incremento noturno de NAT es iniciado por la liberación de la noradrenalina, desde los nervios simpáticos postganglionares que inervan la glándula pineal por medio de los receptores beta adrenérgicos localizados en las membranas de los pinealocitos, lo cual dispara los mecanismos de segundos mensajeros AMP cíclico lo que finalmente resulta el incremento de la actividad de la NAT.²²

Adicionalmente, la noradrenalina estimula los receptores alfa adrenérgicos desencadenando una cascada de procesos de segundos mensajeros (por ejemplo diacilglicerol, inositol trifosfato y ácido fosfatídico) que potencializan la estimulación noradrenérgica para estimular la actividad de la NAT.²² Otros neuroreceptores pueden estar involucrados en la regulación de la actividad de la NAT pineal (GABA) que puede disminuir la actividad de la

NAT.²¹ El péptido vasointestinal vasoactivo aumenta la actividad de la NAT por un mecanismo indiferenciado.²¹

También las prostaglandinas E y F han sido implicadas en el control de la N-acetilación de la serotonina pineal, alterando la sensibilidad del pinealocito a la noradrenalina.⁵⁰

A diferencia de otras hormonas la melatonina no se almacena, una vez que se produce se excreta a la circulación, los niveles pineales y séricos de melatonina siguen un curso paralelo.

La melatonina es rápidamente metabolizada en el hígado y en menor grado en el SNC y sus metabolitos son excretados por la orina,³⁰ sólo el 1% de la melatonina es excretada por la orina sin sufrir cambios. En el hígado presenta una hidroxilación seguido de una conjugación sulfato-glucoronidasa, siendo el principal metabolito hepático el sulfato de 6-hidroxi melatonina ó 6-sulfatohidroxi melatonina (6-SHM),⁴² sin embargo en el SNC el metabolito más común es el N-acetil_5metoxikyuremina. Se ha estimado que el rango de excreción urinaria del 6-SHM en adulto de ambos sexos está entre 6.3-30.9 mcg/hrs. Recientemente se ha detectado otro metabolito, el 2-hidroxi melatonina.⁶³

En estudios realizados en sujetos sanos con un detallado análisis de la excreción de 6-SHM fue de un 80% en excreción urinaria total se presentó durante el periodo de oscuridad.¹

MECANISMO DE ACCIÓN

Los primeros estudios en humanos sugirieron un posible mecanismo de acción de la melatonina en la regulación del inicio del sueño,¹ el incremento noturno de la producción pineal de melatonina está bajo control de la innervación simpática de la glándula pineal.⁶ Se cree que la iniciación de los ritmos de secreción de melatonina están bajo control del núcleo supraquiasmático en el hipotálamo. Las proyecciones caudales del núcleo supraquiasmático (NSQ) incluyen una sinápsis con otro núcleo hipotalámico; el núcleo paraventricular (NPV), posteriormente se establece una sinápsis con la columna intermediolateral de la sustancia gris de la médula cervical torácica. De aquí se envían fibras preganglionares que abandonan la médula cervical para establecer sinápsis con células postganglionares en la cadena cervical simpática. Finalmente, las fibras postganglionares llegan a la glándula pineal en el hipotálamo.³⁴ Durante el periodo de oscuridad, la iniciación de potenciales de acción en el sistema simpático causa la liberación de noradrenalina hacia los receptores noradrenérgicos en la membrana celular del pinealocito, lo que deriva en síntesis de melatonina.³⁵ Durante el día, la actividad neural de las fibras simpáticas que terminan en la pineal, es suprimida por la luz cuya información procede desde la retina por medio del núcleo supraquiasmático.

La mayoría de los trabajos hacia el control de sistemas que generan ritmicidad, en *Hámsters*, se identificó una área del hipotálamo anterior relacionado íntimamente con las respuestas del fotoperiodo, que es diferente de los que generan el ritmo circadiano en el SNC donde existen respuestas bioquímicas como resultado a enlaces de melatonina a receptores.³⁹

EFFECTOS COLATERALES

La administración de melatonina puede producir efectos sobre el estado de ánimo, particularmente en el nivel de alerta.

Ardent y col. han estudiado las posibles complicaciones de la administración exógena de melatonina y el ritmo circadiano.⁷ Este estudio confirmó los efectos de la melatonina sobre la fatiga y la somnolencia⁶ en donde se observó un incremento en la fatiga experimentada al anochecer, además se observó una modificación del momento de secreción de prolactina, que consistió en un declinamiento mas temprano en su periodo de secreción noturno.

Por otro lado no se observaron efectos significativos en el estado de ánimo, de igual manera, las hormonas luteinizante, testosterona, la del crecimiento, tiroxina y cortisol, no sufrieron ningún cambio. Se administró melatonina por un mes a dosis de 2 mg diarios por las tardes, no se presentaron efectos sobre el crecimiento hormonal,⁶² el tiempo de liberación de prolactina fue ligeramente modificado.⁶⁸ En voluntarios sanos, la melatonina produce efectos sedantes comparables a los producidos por dosis clinicamente efectivas de hipnóticos. La melatonina carece de efectos adversos sobre la memoria.⁵⁰

Varios estudios sugieren que a dosis altas de melatonina puede disminuir ligeramente la secreción de gonadotropina e incrementar el crecimiento y secreción de la prolactina en el hombre.⁵⁴

TOXICIDAD.

No se presenta toxicidad en humanos. Se administraron dosis muy altas en roedores y sólo se logró tener una toxicidad extremadamente baja.¹⁷ Tampoco existen contraindicaciones en su empleo en personas sanas.³⁶ Se han administrado grandes dosis en personas con Parkinson observándose solo ligeros efectos.⁴⁹ En pacientes depresivos altas dosis presentan aumento de depresión al atardecer.⁶⁵

II.2 VALIDACIÓN

La validación de métodos analíticos es la evidencia documentada por estudios de laboratorio de que las características del comportamiento del método, satisfacen los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación la podemos dividir en :

Validación Retrospectiva

Validación prospectiva

Validación Retrospectiva .- Es la evidencia documentada, basada en los datos acumulados de producción, análisis y control de que un producto ya en distribución está siendo fabricado con efectividad .

Validación Prospectiva .- Es la evidencia documentada que demuestra, a través de un plan experimental, que las operaciones cumplen consistentemente con el objetivo de su existencia^{3,36}.

Sistema de Revalidación .- Debido a que la validación de un proceso no le da carácter de perpetuidad se deberá contar con un sistema de Aseguramiento de Calidad, el cual advierta la necesidad de una revalidación cada vez que ocurran cambios en la formulación, empaque, manufactura o equipo que pudieran afectar las características del producto. La magnitud de la revalidación dependerá de la naturaleza de los cambios y cómo impactan en cada una de las etapas de producción que se han calificado.

La validación prospectiva de un proceso requiere de la calificación de cada uno de sus elementos principales y la importancia de éstos resulta relativa de un proceso a otro (figura 1) .

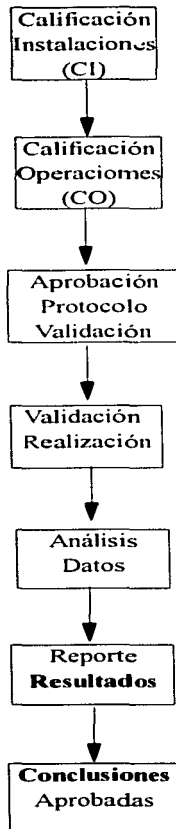


Figura 1 Proceso de Validación Prospectiva.

En el laboratorio , los métodos y procedimientos analíticos constituyen el proceso que debe ser controlado . La validación garantiza que la metodología empleada logre producir los mejores resultados analíticos en cada caso específico. Para ello, todas las variables del método deben considerarse y de acuerdo a la USP XXII estos son: precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, linealidad y tolerancia .

La información que se requiere para la validación de un método analítico depende de la aplicación deseada y en base a esta los procedimientos de ensayo se han clasificado en las siguientes categorías:

CATEGORÍA I

Métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados .

CATEGORÍA II

Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos o productos de degradación en el producto farmacéutico, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límites .

CATEGORÍA III

Métodos analíticos para la determinación de las características del comportamiento del producto (pruebas de disolución, liberación de fármaco, etc.) .

Para cada una de estas categorías los requisitos de validación son diferentes. En la tabla 1 se encuentran los parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos en base a las categorías mencionadas .

TABLA 1

PARÁMETROS NECESARIOS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

PARAMETRO	C A T E G O R I A			
	I	II		III
		Cuantitativa	Prueba de Limite	
Precisión	si	si	no	si
Exactitud	si	si	*	*
Limite de detección	no	no	si	*
Limite de Cuantificación	no	si	no	*
Especificación	si	si	si	*
Intervalo	si	si	*	*
Linealidad	si	si	no	*
Tolerancia	si	si	si	si

* puede o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis particular.

La validación de métodos analíticos debe asegurar que el método, instrumentos, disolventes, reactivos y todos los materiales utilizados durante el análisis son adecuados para el compuesto analizado .

II.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN .

Los parámetros de validación se dividen de la siguiente manera, en base a las características que evalúan el comportamiento del método :

1. Parámetros que evalúan si el sistema es adecuado:

ESPECIFICIDAD

LINEALIDAD

LIMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.

2. Parámetros que evalúan la efectividad del proceso de preparación de la muestra .

EXACTITUD

3. Parámetros que incluyen aspectos relacionados al sistema, al proceso de preparación de la muestra y al analista :

PRECISIÓN

TOLERANCIA

II.2.2 DEFINICIONES EMPLEADAS EN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS 18,53,37,25,24.

ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra, los excipientes, las sustancias relacionadas, solventes residuales y compuestos de síntesis los cuales no deben interferir ni influenciar el resultado analítico .

LINEALIDAD

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que la respuesta analítica es proporcional a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado .

INTERVALO

El intervalo esta definido por las concentraciones superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles) en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal .

EXACTITUD

Es el grado de 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.

PRECISIÓN

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

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

REPETIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (Analista, tiempo, laboratorio , etc.)

PRECISIÓN INTERMEDIA

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (Analista, tiempo , equipos, etc.), en un mismo laboratorio. Conocida anteriormente como reproducibilidad .

REPRODUCIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en diferentes laboratorios, y bajo condiciones diferentes (analista, tiempo, equipos,) .

LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada , pero no necesariamente cuantificada , bajo las condiciones de operación establecidas .

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas .

TOLERANCIA

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

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas .

III. JUSTIFICACIÓN

El egresado de la especialización en estadística aplicada a la salud, debe ser capaz de realizar docencia y asesorías en estadística para la investigación en el campo de la salud y conducir sistemas de información en el área de la salud.

El trabajo fué realizado para dar cumplimiento a la especialización y al mismo tiempo para reportar la aplicación que el profesional egresado de la especialización tiene la capacidad de lograr los tres objetivos. Este trabajo se ubica en la faceta de asesoría para el trabajo de investigación en el área de la salud.

Como resultado de la tendencia hacia la calidad total, en los últimos años la industria farmacéutica ha sufrido una importante transformación debido principalmente a la creciente demanda de nuevos y mejores medicamentos y a las exigencias de las oficinas gubernamentales en relación a los controles que deben llevarse a cabo durante la fabricación y el análisis de los medicamentos con objeto de tener en el mercado formulaciones que cumplan con el propósito para el cual fueron diseñadas y que no existan variaciones de lote a lote del mismo producto.

Es por ello que debe tenerse un perfecto control sobre todos los parámetros involucrados en la fabricación de un medicamento, partiendo desde el diseño, la etapa de desarrollo y la validación de métodos analíticos. El presente trabajo sólo toca una pequeña parte de todo el engranaje involucrado en la producción de un medicamento de calidad: la validación de un método analítico.

En particular se trata de la validación del método para cuantificar melatonina por espectrofotometría (UV) en forma farmacéutica tabletas, el cual satisface la necesidad del laboratorio de contar con un método de análisis que cumple con las particularidades ser rápido, económico y de sencilla realización, lográndose a través de esto obtener un producto de calidad y a un menor costo, lo cual es muy importante para cualquier laboratorio farmacéutico.

Por otro lado la validación de este método permite cumplir con los requerimientos oficiales solicitados por las autoridades sanitarias las cuales exigen que todos los procesos farmacéuticos sean validados.

IV. OBJETIVO

1) IMPLEMENTAR UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE MELATONINA EN TABLETAS UTILIZANDO MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO (UV) .

2) VALIDAR EL MÉTODO IMPLEMENTADO DEMOSTRANDO SU APLICACIÓN CON FINES DE CONTROL DE CALIDAD DE MELATONINA 3 mg / TABLETA .

V. METODOLOGÍA

V.1. PRUEBAS PRELIMINARES

V.1.1.- Calibración del equipo a utilizar :

-espectrofotómetro marca spectronic 21

balanza analítica marca mettler

V.1.2- Análisis y especificaciones de las materias primas:

- principio activo Melatonina

Se analizó de acuerdo a las referencias bibliográficas investigadas,^{59,34,54,35} especificaciones del proveedor y los métodos generales de análisis (MGA) internas de la empresa.

V.2. DESARROLLO DEL MÉTODO

V.2.1- Valoración de melatonina en producto terminado.

La técnica de valoración a desarrollar es la siguiente :

Valoración de Melatonina.

Solución de referencia . Pesar exactamente 30 mg de Std de referencia de Melatonina y disolver en 30 mL de etanol y diluir cuantitativamente con agua, hasta obtener una concentración de 30 mcg/mL .

Preparación de la muestra . Pesar y triturar no menos de 20 tabletas, pesar el equivalente a 3 mg de melatonina, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 30 mL de etanol, agitar durante 10 minutos y llevar al aforo con agua destilada, filtrar y obtener una concentración final de 30 mcg/mL.

Procedimiento : Leer en el espectrofotómetro en la región UV a una longitud de onda de 307 nm . Calcular la cantidad en mg de Melatonina en la porción de muestra tomada, por medio de la siguiente fórmula $DC(A_m/A_{ref})$ en donde C es la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de Melatonina en la solución de referencia D es el factor de dilución de la muestra : A_m y A_{ref} son las absorbancias obtenidas con la solución de la muestra y la de referencia respectivamente .

Ver diagrama en la pagina siguiente .

TÉCNICA DE ANÁLISIS DE PRODUCTO TERMINADO (MELATONINA)

TABLETAS DE MELATONINA

PESAR UNA MUESTRA EQUIVALENTE A 3 mg DE MELATONINA.

↓

COLOCAR LA MUESTRA EN MATRAZ VOLUMETRICO DE (100 mL)

↓

AGREGAR 30 mL DE ETANOL Y AGITAR DURANTE 10 MINUTOS.

↓

AFORAR CON AGUA DESTILADA Y FILTRAR

↓

OBTENER UNA CONCENTRACIÓN FINAL DE 30 mcg/ml .

SUSTANCIA DE REFERENCIA

PESAR 30 mg DEL ESTÁNDAR Y COLOCARLOS EN UN MATRAZ DE 100 mL

↓

AGRAGAR 30 ml DE ETANOL Y DISOLVER, AFORAR CON AGUA DESTILADA.

↓

OBTENER UNA CONCENTRACIÓN FINAL DE 30 mcg/ml

↓

LEER EN EL ESPECTROFOTOMETRO A 307 mn.

V.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método a validar es para aplicar en control de calidad, por lo que se realizaron la determinación de los siguientes parámetros analíticos :

V.3.1 ESPECIFICIDAD

V.3.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA

V.3.3 PRECISIÓN DEL SISTEMA

V.3.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

V.3.5 EXACTITUD DEL MÉTODO

V.3.6 PRECISION INTERMEDIA

V.3.7 TOLERANCIA

V.3.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

El análisis de resultados se llevó a cabo por el método computarizado “VALIDA” elaborado por el Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A.

V.3.1 ESPECIFICIDAD

- a) Preparar placebos del producto .
 - b) Identificar la respuesta del activo, y si procede de los excipientes y/o de otras sustancias presentes(para control de calidad y estabildades)
 - c) En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras con placebo “añadido” de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto .
- Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones (para indicadores de estabilidad) .

En este caso específico, el placebo y la muestra se expusieron 3 condiciones diferentes y envases de plástico pvc .

Condición	Período	Envases
1) Luz blanca	30 días	Plástico(pvc)
2) 45 °C	30 días	Plástico(pvc)
3) 60 °C	30 días	Plástico(pvc)

Criterio:

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes .

V.3.2 LINEARIDAD DEL SISTEMA:

A) Se prepara una solución patrón de nuestro principio activo.

B) Se preparan 5 concentraciones (80 , 90 , 100 ,110 y 120 %) por duplicado a partir de nuestra solución patrón utilizando diluciones en la cual deberá estar incluido el 100 % de la formula unitaria.

C) Se analizan estas diluciones de acuerdo a la técnica establecida y se realiza por triplicado.

D) Se construye la curva de calibración a partir de los datos obtenidos.

E) Demostrar mediante una prueba estadística que la respuesta determinada va de acuerdo con la respuesta esperada o la desviación con respecto a la linealidad no afecta los resultados en la región normal de análisis por mas de +/- 3 % .

Procedimiento estadístico ver anexo 2 página (57) .

CRITERIO

CV 1.5 %

r 0.99 r² 0.98

V.3.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

A) se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados) . Cada uno de manera independiente y haciendo el análisis por triplicado .

B) Las concentraciones de los placebos cargados deben ser adecuadas para que, utilizando el método propuesto , las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 % .

Procedimiento estadístico ver anexo 2 página (60) .

CRITERIO

Al graficar la cantidad adicionada contra cantidad recuperada :

$$m = 1$$

$$B = 0$$

$$R^2 = 0.98$$

Los cv a cada nivel y los globales deben estar de acuerdo a la siguiente tabla .

MÉTODOS	PROMEDIO DE RECOBRO	CV
CROMATOGRÁFICOS	98-102 %	2%
TITULOMÉTRICOS	98-102 %	2%
QUÍMICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS	97-103 %	3%
MICROBIOLÓGICOS	95-105 %	5%

V.3.4 EXACTITUD

A) Se debe analizar cuando menos 6 placebos cargados con el 100 % del principio activo (3mg/100ml), de manera independiente, por un mismo analista y en las mismas condiciones de análisis .

B) Un analista debe de preparar de manera independiente, por lo menos 6 placebos adicionados al 100 % de la cantidad del principio activo indicada en la fórmula unitaria y recuperar la sustancia de interés mediante el método de medición, bajo las mismas condiciones de análisis .

Procedimiento estadístico ver anexo 2 página (61)

CRITERIO.

Los porcentos de recobro deben encontrarse en el intervalo indicado en la tabla anterior

V.3.5 PRECISIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN

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

Procedimiento estadístico ver anexo 2 página (61)

CRITERIO

CV 1.5 %

V.3.6 PRECISIÓN INTERMEDIA (ANTES REPRODUCIBILIDAD)

Analizar una muestra homogénea del producto terminado cercana al 100 % de la concentración teórica, el análisis debe realizarse por dos analistas en dos días diferentes , por triplicado cada día y realizando tres lecturas de cada muestra. Uno de los analistas puede ser un químico del departamento de control de calidad para efectuar al mismo tiempo la transferencia del método analítico .

Nota : para que esta prueba tenga validez es necesario contar con la técnica definitiva escrita y que el analista la siga al pie de la letra .

Procedimiento estadístico ver anexo 2 .

CRITERIO:

El cv total debe cumplir con los siguientes criterios .

METODOS	CV
CROMATOGRÁFICOS	2 %
TITULOMÉTRICOS	2 %
QUÍMICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS	3 %
MICROBIOLÓGICOS	5 %

V.3.7 TOLERANCIA

Se analiza una muestra por triplicado en las condiciones normales enseguida se analizan muestras modificando dichas condiciones .

Se calculan los porcentajes promedios obtenidos para la condición normal y para las condiciones modificadas .

CRITERIO

La diferencia entre el promedio de las condiciones normales y las modificadas no debe ser mayor al porciento indicado en la siguiente tabla (magnitud del efecto) .

METODO	MAGNITUD DEL EFECTO
CROMATOGRÁFICOS	+ / - 2 %
QUÍMICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS	+ / - 3 %
MICROBIOLÓGICOS	+ / - 5 %

Un método tolerable debe proporcionar desviaciones entre laboratorios ligeramente mas grandes que las obtenidas en el mismo laboratorio .

V.3.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

Se analiza una muestra por triplicado en las condiciones normales, en seguida se almacenan las muestras bajo diferentes condiciones como por ejemplo; temperatura ambiente, refrigeración , protegidas de la luz , etc., al cabo del tiempo determinado reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operacion , utilizando una solución de referencia recientemente preparada para cada condición .

La determinación debe ser efectuada por el mismo analista .

CRITERIO

La diferencia entre el promedio de las condiciones normales y el promedio de obtenido a cada condición no debe ser mayor al porciento indicado en la siguiente tabla (magnitud del efecto) .

METODOS	MAGNITUD DEL EFECTO
CROMATOGRÁFICOS	+ / - 2%
TITULOMÉTRICOS	+ / - 2 %
QUÍMICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS	+ / - 3%
MICROBIOLÓGICOS	+ / - 5 %

VI. RESULTADOS

VI.1 CALIBRACIÓN DE INSTRUMENTOS

IV.1.1. BALANZA ANALÍTICA MARCA METTLER

MARCO DE PESAS	LECTURA DEL INSTRUMENTO
1.- 0.0100g	00.010g
2.- 0.0500g	00.050g
3.- 0.1000g	00.100g
4.- 0.5000g	00.500g
5.- 1.0000g	01.000g
6.- 5.0000g	05.000g
7.- 10.0000g	10.0005g
8.- 20.0000g	20.000g
9.- 50.0000g	50.000g
10.-100.0000g	100.000g

Marco de pesas utilizado : Marca ; Sartoris Clase E2 .

IV.1.2 ESPECTROFOTÓMETRO ESPECTRONIC 21

Se preparó una solución de $K_2Cr_2O_7$ a partir de esta obtienen 5 diluciones teniendo concentraciones de 8,16,24,36, y 40 mg / litro. Estas son leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 370 nm y graficar resultados

Concentración (mg/l)	Absorbancias
8	0.236
16	0.473
24	0.685
36	0.899
40	1.193

Ver gráfica Anexo 1

VI.2 ANALISIS DE ESPECIFICACIONES

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD		ANÁLISIS No.	HOJA: 1 de 1
REPORTE FÍSICO-QUÍMICO DE MATERIA PRIMA		MCC No: REEMPLAZA A: FORMA No:	
NOMBRE DE LA MATERIA PRIMA	CÓDIGO	ELABORO: H.E.L.	
MELATONINA		FIRMA:	
CANTIDAD:	PROVEEDOR:	REVISADA:	
FECHA DE ENTRADA:		FIRMA:	
FECHA DE MUESTREO:	LOTE PROVEEDOR	AUTORIZO:	
FECHA DE ANALISIS		FIRMA:	
LOTE INTERNO:		FECHA DE ELABORACIÓN:	OCTUBRE 1995
REF.: U.S.P. XXII N.F. XVII; F.E.U.M. 6ª EDICIÓN			
DETERMINACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS	
DESCRIPCION	POLVO BLANCO CRISTALINO		
SOLUBILIDAD	LIGERAMENTE SOLUBLE EN AGUA Y ALCOHOL, PRACTICAMENTE INSOLUBLE EN CLOROFORMO Y ACETONA.		
ENSAYOS DE IDENTIDAD	A. MGA 0351 EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN INFRAROJA DA UNA DISPERSIÓN EN BROMURO DE POTASIO, EMBELEMADO A LA MISMA LONGITUD DE ONDA QUE UNA STD. B. MGA 0361 EN UNA SOLUCIÓN CON UNA SOLUCIÓN AGUA ETANOL, DEBE PRESENTAR EN LA REGIÓN UV MÁXIMOS Y MÍNIMOS QUE UN ESTÁNDAR. C. MGA 0241 (CASA DELGADA) CORRESPONDE EL RETIENEN OBTENIDO DE UN STD DE REFERENCIA EN EL CROMATOGRAMA.		
TEMPERATURA DE FUSIÓN	116-118 °C		
pH	5-7 (en 50mg/mL agua destilada)		
PERDIDA POR SECADO	NO MÁS DEL 1%.		
SUSTANCIAS RELACIONADAS	CORRESPONDE		
VALORACION	NO MENOS DEL 99% Y NO MÁS DEL 101 % CALCULADO EN LA SUSTANCIA ANHIDRA		
APROBADO:	ANÁLIZO/FECHA	AUTORIZO	
RECHAZADO:			
OBSERVACIONES Y/O CALCULOS:			
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD.		ANÁLISIS No.	HOJA: 1 de 1

ESPECIFICACIONES		MCC No.:
PRODUCTO TERMINADO		REEMPLAZA A:
		FORMA No.:
NOMBRE DEL PRODUCTO	CÓDIGO	ELABORO: <i>HEL</i>
		FIRMA:
PRINCIPIO(S) ACTIVO(S)	mg	REVISADA:
MELATONINA	3	FIRMA:
FECHA DE FABRICACION:	LOTE PROVEEDOR	AUTORIZO:
FECHA DE ANALISIS		FIRMA:
LOTE :		FECHA DE ELABORACIÓN: OCTUBRE 199
REF. : U.S.P. XXII N.F. XVII; F.E.U.M. 6ª EDICIÓN		
DETERMINACION	ESPECIFICACION	
DESCRIPCION	<i>Tableta redonda ranurada con bordes bien definidos</i>	
PRUEBAS ORGANOLEPTICAS	<i>Inodora, blanca no presenta manchas ni partículas visibles.</i>	
IDENTIDAD	<i>POSITIVA A, B, C.</i>	
VARIACION DE PESO	<i>+ - 7 %</i>	
PESO PROMEDIO	<i>150 mg</i>	
DESINTEGRACION	<i>MÁXIMO 15 MIN</i>	
VALORACION MELATONINA	<i>CONTIENE NO MENOS DEL 95 % Y NO MAS DEL 105 % DE CANTIDAD DE MELATONINA</i>	
SUSTANCIAS RELACIONADAS	<i>MGA 0241. OBSERVAR EL CROMATOGRAMA OBTENIDO EN EL ENSAYO DE IDENTIDAD B LA MANCHA OBTENIDA EN EL CROMATOGRAMA.</i>	
PRUEBA DE SELLADO	<i>MIENOS DE 1.0 %</i>	
APROBADO:	ANALIZO/FECHA	AUTORIZO
RECHAZADO:		
OBSERVACIONES Y/O CALCULOS:		

VI.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

VI.3.1 Especificidad del método

Resultados analíticos de la muestra, y el placebo sometidos a diferentes condiciones .

1) Resultados de la muestra :

Condición	Periodo	Inicial	Final
Luz blanca	30 días	100.20	100.20
A 45° C	30 días	100.20	100.12
A 60° C	30 días	100.20	99.5
A 70 +/- 5 %HR	30 días	100.20	90.2

Aspecto de la muestra : Para cualquier condición , cumple con las especificaciones .

Criterio de especificaciones :

Tableta blanca o ligeramente color crema, sabor ligeramente característico sin aroma libre de partículas extrañas con bordes bien definidos

2) Resultados del placebo:

Se pudo comprobar con el método desarrollado, que no existen productos de degradación y/o sustancias relacionadas que interfieran con la cuantificación de la melatonina .

Aspecto del placebo : Para cualquier condición, cumplen con las especificaciones .

Ver espectros en el anexo 1

VI.3.2 Linealidad del Sistema

1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK

Peso de la sustancia de referencia (mg)	Dilución	Concentración ()
30	100	0.30 mg/mL

Sustancia de referencia :

Nombre : MELATONINA

Lote : _____ Potencia : 99.0 Caducidad : _____

Datos del equipo :

Equipo : ESPECTROFOTÓMETRO

Marca : ESPECTRONIC 21 Código : 1004329

TABLA DE DATOS

%	Nivel	ALICUOTA (mL)	AFORO mL	Concentración mcg/mL
80		2	25	72
90		9	100	81
100		10	100	90
110		11	100	99
120		3	25	108

Elaboró: MSRG _____ Revisó: _____

Firma/Fecha _____ Firma/Fecha : _____

(Linealidad del sistema)

Se construyó una curva de calibración en el rango de 72 - 108 mcg/mL (80-120 %)

Nivel	Prep. No.	Concentración (mcg/mL)	Respuesta (Absorbancia)	Factor (Respuesta / Concentración)
80	1	72	0.470	0.00652
80	2	72	0.471	0.00654
80	3	72	0.469	0.00651
90	1	81	0.521	0.00643
90	2	81	0.522	0.00644
90	3	81	0.519	0.00640
100	1	90	0.575	0.00638
100	2	90	0.575	0.00638
100	3	90	0.573	0.00636
110	1	99	0.628	0.00634
110	2	99	0.628	0.00634
110	3	99	0.627	0.00633
120	1	108	0.680	0.00629
120	2	108	0.679	0.00628
120	3	108	0.680	0.00629

Linea de regresión $Y = 0.00583 * X - 0.05033$

Ordenada al origen : 0.05033

Pendiente : 0.00583

	RESULTADOS	CRITERIO
Coefficiente de Variación (C.V.)	1.3	1.5 %
Ordenada al origen (b)	0.05033	-----
Pendiente (m)	0.00583	-----
Coefficiente de determinación (r ²)	0.99992	0.98

Resultado: Existe relación lineal entre la respuesta y la concentración en el intervalo de 72 mcg/mL a 108 mcg/mL

(Linealidad del sistema)

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA (ANAEVA)

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	0.08311	0.08311	61043.83
ERROR DE REGRESIÓN	13	0.00001	0	
FALTA DE AJUSTE	3	0	0	.51852
ERROR PURO	10	0.00001	0	

Determinar en la tabla de la distribución "F" los valores para :
 $F (gl_r, gl_{er} ; 0.01)$ y $F (gl_{fa}, gl_{ep} ; 0.05)$:

$$F (1, 13 ; 0.01) = 9.07$$

$$F (3, 10 ; 0.05) = 3.71$$

$$\frac{61043.83}{9.07}$$

Si $F_r F (gl_r, gl_{er} ; 0.01)$:

Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida .

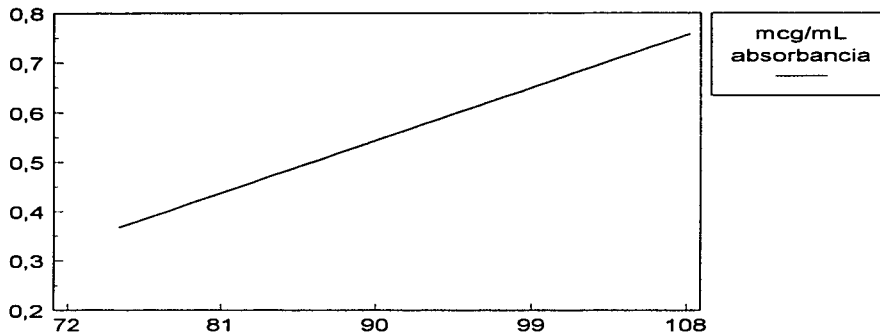
$$\frac{0.51852}{3.71}$$

Si $F_{fa} F (gl_{fa}, gl_{ep} ; 0.05)$

No existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida

**Resultado: Existe relación altamente significativa de la cantidad adicionada (mg) y absorbancias .
 El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre absorbancias con mg .**

GRAFICA 1
LINEALIDAD DEL SISTEMA



VI.3.3 Linealidad del Método

I. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN REFERENCIA

Peso de la sustancia de referencia (mg)	Dilución	Concentración (mcg/mL)
30	100	30

Sustancia de referencia :

Nombre : MELATONINA

Lote : 86H0329

Potencia : 99.0

Caducidad :

Datos del equipo :

Equipo : ESPECTROFOTOMETRO

Marca : ESPECTRONIC 21

Código : 1004324

Rango de la curva de calibración : 270mg/100mL – 330mg/100 mL (90-110%)

Nivel %	Peso activo (mg)	Peso excipientes (mg)	ALICUOTA (mL)	AFORO (mL)	Concentración (mcg/mL)
90	270	100	3	100	81
100	300	100	3	100	90
110	330	100	3	100	99

Elaboró: _____ Revisó: _____

Firma/Fecha: _____ Firma/Fecha : _____

Curva de calibración Cantidad adicionada contra cantidad recuperada
(Linealidad del método)

Nivel	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
90	267.30	267.8919	100.22
90	267.30	268.3974	100.41
90	267.30	271.4300	101.54
100	297.00	294.6811	99.21
100	297.00	295.1866	99.38
100	297.00	298.7245	100.58
110	326.70	326.5249	99.94
110	326.70	328.5464	100.56
110	326.70	331.5795	101.49

De la gráfica cantidad adicionada contra cantidad recuperada

Linea de regresión : $Y = 1.0040 * X - 0.1093$

Ordenada al origen : -0.1093 Pendiente : 1.0040

	RESULTADOS	CRITERIO
Coefficiente de Variación (C. V.)	0.80	2.0 %
Ordenada al origen (b)	-0.1093	aprox = 0
Pendiente(m)	1.0040	aprox = 1
Coefficiente de determinación (r^2)	.9905	0.98

(Linealidad del método)

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA (ANAEVA)

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	5331.188	5331.188	804.5558
ERROR DE REGRESIÓN	7	51.125	6.62625	
FALTA DE AJUSTE	1	21.0937	21.0937	4.2143
ERROR PURO	6	30.0312	5.0052	

Determinar en la tabla de la distribución "F" los valores para :
 $F(1, 13; 0.99)$ y $F(1, 13; 0.95)$:

$$F(1, 13; 0.99) = 9.07$$

$$F(1, 13; 0.95) = 6.55$$

$$\frac{804.5558}{9.07}$$

Si $F_r > F(1, 13; 0.99)$:

Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida .

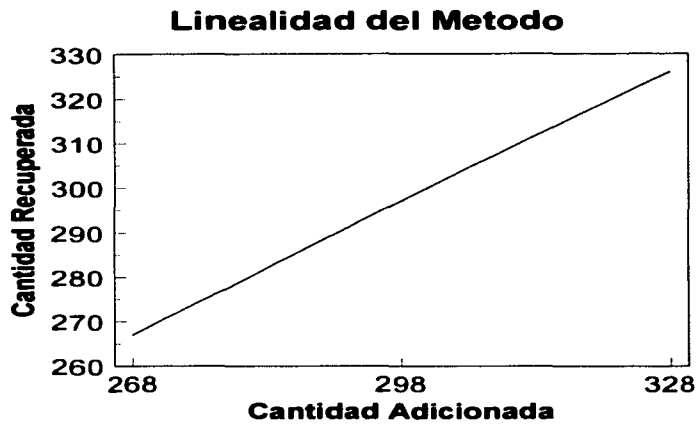
$$\frac{4.2143}{6.55}$$

Si $F_{fa} > F(1, 13; 0.95)$:

No existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida

Resultado: Existe relación altamente significativa de la cantidad adicionada (mg) y absorbancias .
El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre absorbancias con mg .

GRÁFICO 2



VI.3.4 EXACTITUD

Se determinó analizando muestras de placebo adicionadas con el ingrediente activo a tres diferentes concentraciones (90-110 %) y analizadas con el método propuesto, en relación con una solución de referencia .

Nivel	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado	Desviación (%)	Diferencia promedio (%)	Promedio (%)
90	267.30	267.8919	100.22	0.22		
90	267.30	268.3974	100.41	0.41	0.72	100.72
90	267.30	271.4300	101.54	1.54		
100	297.00	299.7000	101.01	1.01		
100	297.00	298.0350	100.44	0.44		
100	297.00	301.6980	101.68	1.68	0.81	100.81
100	297.00	298.7010	100.67	0.67		
100	297.00	298.7010	100.67	0.67		
100	297.00	298.0350	100.44	0.44		
110	326.70	326.5249	99.94	-0.06		
110	326.70	328.5464	100.56	0.56	0.49	100.49
110	326.70	331.5795	101.49	1.49		

	RESULTADOS	CRITERIO
Promedio de recobro (100%)	100.81	97-103%
Desviación estandar (100%)	0.47	2 %
Repetibilidad del Método	+/- 0.92	2 %

Precisión del sistema al 100 %

Concentración : 30 mcg / mL (Nivel 100 %)

	Respuesta
	0.575
	0.575
	0.573
	0.574
	0.572
	0.571
Promedio	0.573
C.V.	0.3 %

Criterio

CV

1.5 %

Resultado : El sistema es preciso a la concentración de 30 mcg/mL (Nivel 100%)

Precisión intermedia del método para MELATONINA 30mg/100mL

La precisión del método se evaluó analizando seis muestras , por dos analistas leyendo cada una de estas tres veces .

No. de analistas : n = 2
No. de muestras: m = 6
No. de réplicas: l = 3

No de Lote : 32P123
Cantidad : 200 fcos.de Tabletas
3 mg

Analista No. 1

Muestra No.	1	2	3	Promedio
1	99.81	99.98	100.15	99.98
2	101.02	100.67	100.67	100.78
3	99.46	99.64	99.46	99.52
4	101.37	100.84	101.02	101.07
5	99.07	98.89	99.07	99.01
6	98.54	98.72	98.54	98.60

Analista No. 2

Muestra No	1	2	3	Promedio
1	100.40	99.80	100.90	100.36
2	100.96	101.30	101.50	101.25
3	100.20	100.20	100.07	100.15
4	100.70	100.94	100.70	100.78
5	101.40	101.40	100.94	101.24
6	100.40	101.66	100.94	101.00

Promedio total : 100.31 %

CV total	0.8827
Reproducibilidad Interanalista	1.2641
Reproducibilidad Interdia/analista	1.5663

Criterio : Coeficiente de variación menor al 2%

Precisión intermedia

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA (ANAEVA)

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
ANALISTA	1	2.8359	2.8359	8.3448
DIA	2	0.6796	0.3398	0.5321
ERROR	8	5.1093	0.6386	--

Determinar en la tabla de la distribución "F" los valores para :

(1) F (gl a, gl d ; 0.05) y (2) F (gl d , gl e ; 0.05) :

sustituyendo :

(1) F (1, 2 ; 0.05) = 18.5

y

Fa = 8.3448

(2) F (2 , 8 ; 0.05) = 4.46

Fd = 0.5321

**Si Fa F (gl a , gl d ; 0.05) :
8.3448 18.5**

**El método analítico es reproducible por los
analistas**

**Si Fd F (gl d , gl e ; 0.05)
0.5321 4.46**

**El metodo analítico es reproducible en dis -
tintos dias por un mismo analista .**

Resultado : El analista no presenta efecto sobre la valoración .

No existe efecto de los días para un analista en la valoración .

Tolerancia

Se evaluaron tres muestras a las que se les modifico el pH (3,5) y la temperatura (50- 4 °C)

muestra/condición	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Analisis Inicial	100.02	100.22	100.07
pH 3	100.89	101.23	100.72
<i>desviación entre las condiciones iniciales y las ensayadas</i>	0.87	1.01	0.65
pH 5	99.00	98.82	98.48
<i>desviación entre las condiciones iniciales y las ensayadas</i>	-1.02	-1.40	-1.59
4 °C	100.75	100.40	100.09
50 °C	101.95	101.90	102.10
<i>desviación entre las condiciones iniciales y las ensayadas</i>	1.73	1.18	2.02

Criterio : La diferencia entre el promedio de las condiciones normales y las modificadas no debe ser mayor a +/- 3 % .

Resultado: Se considera que el metodo analitico propuesto es tolerable a la modificación de pH y temperatura , puesto que no hay alteraciones significativas en los resultados obtenidos .

Estabilidad de la solución de las muestras de MELATONINA

Se almacenaron soluciones listas para ser medidas de las muestras así como también de las sustancias de referencia en su primera y segunda dilución y se almacenaron durante 24 horas en refrigeración cuantificandolas con soluciones de referencia recientemente preparadas .

Condición	M1	M2	M3	REF 1	REF 2
Analisis inicial	100.50	100.33	100.50	100	100
Soluciones de referencia almacenadas durante 24 horas en refrigeración (segunda dilución)				99.93	99.95
<i>Desviación entre la condición inicial y la ensayada</i>				0.07	0.05
Soluciones de referencia almacenadas durante 24 horas en temperatura ambiente .				99.77	99.82
<i>Desviación entre la condición inicial y la ensayada</i>				0.23	0.18
Muestras almacenadas en matraz y en refrigeración durante 24 horas .	101.02	100.67	100.67		
<i>Desviación entre la condición inicial y la ensayada.</i>	0.52	0.34	0.17		
Muestras almacenadas en matraz y a temperatura ambiente durante 24 horas	100.32	100.15	100.15		
<i>Desviación entre la condición inicial y la ensayada</i>	0.18	0.18	0.35		

Criterio : La diferencia entre los valores iniciales y a la condición ensayada deben ser menores a 2% .

VII. DISCUSIÓN

Especificidad

Criterios :

1. Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes .

Dictamen : Cumple

2. Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas, no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado .

Dictamen : Cumple

Por lo tanto, el método propuesto para MELATONINA, se considera específico y puede ser utilizado como indicativo de estabilidad.

Linealidad del sistema

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
CV	1.5 %	1.3
r	0.99	0.999
r ²	0.98	0.999
m	0	0.005

De acuerdo a los resultados obtenidos el sistema espectrofotométrico, origina una respuesta lineal de melatonina, en el intervalo de 72 - 108 mcg/mL en cuyo punto intermedio se encuentra el 100 % de la cantidad a cuantificar por el método de análisis.

La linealidad del sistema nos indica la existencia de la correlación entre la concentración y la respuesta obtenida de melatonina. Una línea recta que pase por el cero, indica una linealidad apropiada del instrumento dentro del intervalo establecido.

Linealidad del método

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
m	aprox. 1	1.004
b	aprox.0	-0.109
r ²	0.98	0.990
% de recobro	97-103 %	100.37
CV	3 %	0.80

La linealidad del método nos demuestra la capacidad del método de proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración de melatonina en la muestra dentro del intervalo de concentración establecido. De acuerdo a los resultados de los parámetros evaluados el método se considera lineal, ya que la relación de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada, presenta el comportamiento de una línea recta .

Exactitud

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
% de recobro	97-103 %	100.81
CV	3 %	0.47

El método es exacto por lo que existe una concordancia absoluta entre el contenido de melatonina obtenido al aplicar el método a la muestra y el valor verdadero del contenido del analito en la muestra .

Precisión del Sistema

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
CV	1.5 %	0.3

Con los resultados de esta prueba queda establecido que el sistema espectrofotométrico elegido es capaz de detectar siempre la misma cantidad de la sustancia de interés, con mínima variación, cuando es analizada repetidamente.

Precisión Intermedia

Parámetro CV	Criterio de aceptación 2 %	Resultado 0.88
-----------------	-------------------------------	-------------------

Existe precisión del método analítico ya que el resultado se encontro dentro de los limites de aceptación, por lo que podemos decir que existe concordancia entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes de operación aplicados solo en nuestro laboratorio .

Tolerancia

Se considera que el método analítico propuesto es tolerante a la modificación de temperatura y pH , pues no hay alteraciones significativas en la respuesta obtenida .

Estabilidad de la muestra

Parámetro MAGNITUD DEL EFECTO	Criterio de aceptación +/- 2%	Resultados (%)
Muestra(T.A. °C)		0.18, 0.18, 0.35
Muestra(Refrigeración)		0.32 ,0.34, 0.17
Referencia(T.A. °C)		0.3 , 0.38
Referencia(Refrigeración)		0.68, 0.51

La muestra probó ser estable a temperatura ambiente y en refrigeración.

DICTAMEN : Cumple

Las soluciones de referencia sometidas en refrigeración.

DICTAMEN : Cumple

Las soluciones de referencia a temperatura ambiente

DICTAMEN : Cumple

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos con los diferentes parámetros calificados, en la validación del método analítico por espectrofotometría en la región de UV para la determinación de la melatonina queda establecido, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas para el cual fue diseñado.

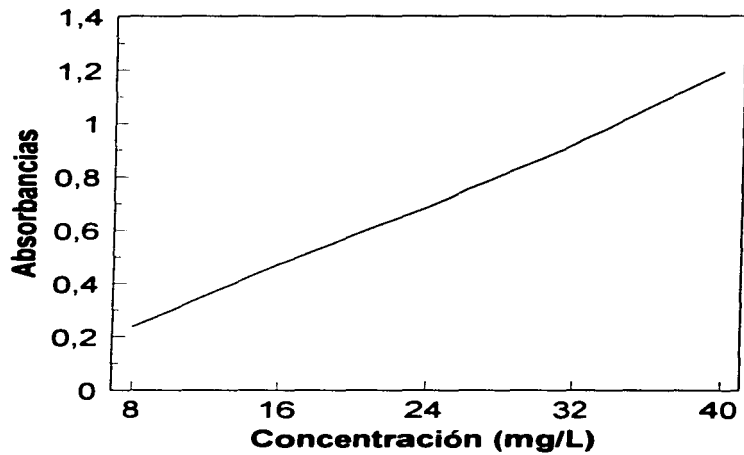
Así pues, el método analítico probado es específico, reproducible, sencillo, sensible, rápido y confiable facilitando el análisis de un medicamento en tabletas que contienen MELATONINA, además resultó exacto, repetible y lineal en el intervalo de 80 a 120 % cumpliendo con los requisitos necesarios para ser empleado en el análisis de control de calidad de este medicamento así como su empleo en la determinación de estabilidad acelerada del producto.

La mayor parte de las decisiones que se toman en la función de calidad, como en la mayoría de las demás áreas reposan en una base estadística, por lo que el principal componente en un programa de validación de métodos analíticos es el recurso humano, dicho recurso debe tener conocimientos en estadística que le ayuden a tomar decisiones al analizar la información proveniente del estudio de los parámetros analíticos por experimentación.

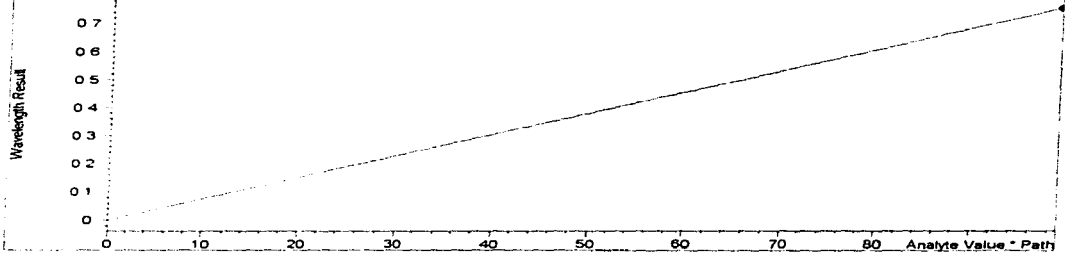
La aplicación de los modelos estadísticos, así como su interpretación, resulta ser toda una metodología científica para la validación de procesos y métodos analíticos, en la industria Farmacéutica. Lo anterior implica un programa de capacitación permanente, o de la captación de especialistas en estadística, por lo que este trabajo demuestra que existe una vinculación entre los programas impartidos en la especialización en ESTADÍSTICA APLICADA A LA SALUD y el perfil de egresados requerido no sólo en el área de la salud, sino también en la manufactura de medicamentos.

A N E X O 1

**Gráfica de calibración del Espectrofotómetro Espectronic 21
con dicromato de potasio.**



Calibration Curve:



Correlation coefficient: 1.00000
Calibration equation : Conc. = 131.73000 % * Abs

#	Standard Name	CONC. (%)	Abs<280nm>	%Error
1	MELATONINA	99.00000	0.75155	0.00

Calibrated at: Date 04/04/97 Time 14:01:01 Operator: FARCORAL

*** End Quantification Method ***

Method file : FARCORAL.M Last update: Date 04/04/97 Time
 14:01:01
 Information : Default Method
 Operator : FARCORAL
 Product : UV-Visible ChemStation

 Prompt for sample information : on
 Prompt for standard information: on

Spectrophotometer

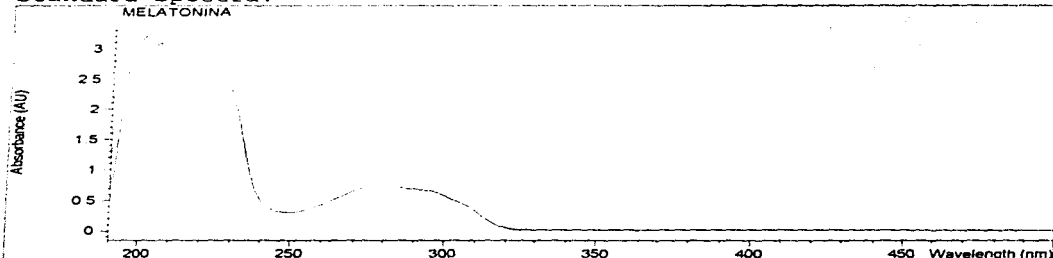
Instrument : 8453
 Acquisition range : 190 to 1100 nm
 Interval : 1 nm
 Integration Time : 0.5 s
 Std. Deviation : On

Data Analysis

Data Type : Absorbance
 Display spectrum : 190 to 500 nm
 Used Wavelength : 280 nm
 Background correction : none

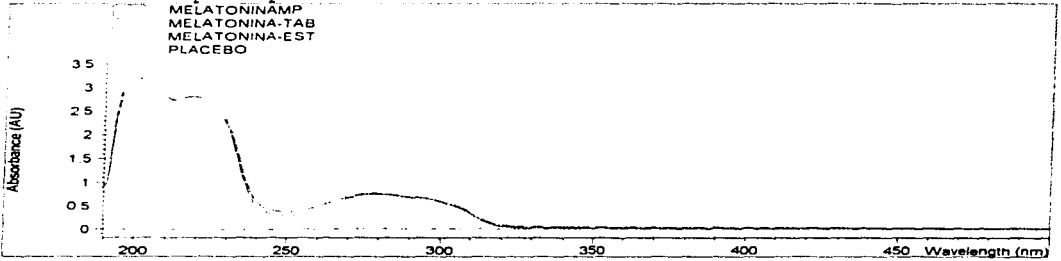
Analyte name : CONC.
 Concentration unit : %
 Calibration Curve : Linear (Beer's law)

Standard Spectra:



Method file : FARCORAL.M Last update: Date 04/04/97 Time 14:01:01
 Information : Default Method
 Data File : <untitled>

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : CONC.
 Calibration equation: Conc. = 131.73000 % * Abs

Calibrated at : Date 04/04/97 Time 14:01:01 Operator: FARCORAL

#	Name	Dilut. Factor	CONC. (%)	Abs<280nm>
1	MELATONINAMP	1.00000	99.34000	0.75413
2	MELATONINA-TAB	1.00000	101.93000	0.77380
3	MELATONINA-EST	1.00000	107.94000	0.81944
4	PLACEBO	1.00000	0.98904	7.5083E-3

Report generated by : FARCORAL Signature:

 *** End Quantification Report ***

ANEXO II

PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

LINEALIDAD DEL SISTEMA

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Cantidad adicionada (x)	Propiedad medida (y)	Total (Yi)
----------------------------	-------------------------	---------------

2) Calcular la suma de la cantidad adicionada (Sx), la suma de cuadrados de la cantidad adicionada (Sx^2), la suma de la propiedad medida (Sy), la suma de cuadrados de la propiedad medida (Sy^2), la suma del producto de la cantidad adicionada por la propiedad medida (Sxy), la suma de cuadrados de los totales (SYi^2) y determinar el número de concentraciones (r) y el número de pares ordenados ($n=rt$).

3) Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b) con las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{n \cdot Sxy - Sx \cdot Sy}{n \cdot Sy^2 - (Sx)^2}$$

$$b = \frac{Sy - m \cdot Sx}{n}$$

CONSTRUCCIÓN DE LA TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

4) Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCr) y la suma de cuadrados del error de regresión (SCer) con las siguientes ecuaciones:

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

$$SCer = Sy^2 - m(Sxy) - b(Sy) =$$

5) Calcular la suma de cuadrados del error puro (SCep) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCfa) con las siguientes ecuaciones:

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

$$SCfa = SCer - SCep$$

donde " r " = número de realizaciones

6) Construir la tabla de análisis de varianza (ANDEVA)

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	SCr	MCr	$F_r = SCr/MC_{er}$
ERROR DE REGRESIÓN	n-2	SCer	MC_{er}/g_{ler}	
FALTA DE AJUSTE	(n-2)-t(r-1)	SCfa	MC_{fa}/g_{lfa}	$F_{fa} = MC_{fa}/MC_{ep}$
ERROR PURO	t(r-1)	SCep	MC_{ep}/g_{lep}	

7) Determinar en la tabla de distribución de "F" los valores para F (gl r, gl er; 0.01) y F (gl fa, gl ep; 0.05)

$F (1, n-2; 0.01)$

$F ((n-2) - t(r-1), t(r-1); 0.05)$

8) Establecer la decisión con base a la siguiente regla:

Si $F_r > F (g_{lr}, g_{ler}; 0.01)$: Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida .

Si $F_r < F (g_{lr}, g_{ler}; 0.01)$: No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Si $F_{fa} > F (g_{lfr}, g_{lfer}; 0.05)$: Existe falta de ajuste a la relación lineal simple a la cantidad adicionada propiedad medida.

Si $F_{fa} < F (g_{lfr}, g_{lfer}; 0.05)$: No existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida.

9) Calcular el coeficiente de determinación (R^2) a través de la siguiente ecuación:

$$R^2 = \frac{(n(S_{xy}) - (S_x)(S_y)^2)}{(n(S_x^2) - (S_x)^2)(n(sy^2) - (Sy)^2)}$$

LINEALIDAD DEL MÉTODO

1) Tabular los datos en base al siguiente formato:

Placebo cargado con el principio activo.

Cantidad adicionada (x)

x11, x12, x1n
 x21, x22, x2n
 x31, x32, x3n
 xt1, xtn

Concentración obtenida usando el método propuesto.

Cantidad recuperada (y)

y11, y12 y1n
 y21, y22, y2n
 y31, y32, y3n
 yt1, yt-n

r = Número de cantidades adicionadas (concentraciones conocidas)

n = Número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada

2) Cálculos preliminares:

Correlacionar la cantidad adicionada (x) vs la cantidad recuperada (y) y obtener m, b y r²

3) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación.

3.1 Calcular el porcentaje recuperado R para la cantidad recuperada con la siguiente ecuación:

$$R = (x/y) 100$$

3.2 Calcular la desviación estandar del porcentaje de recobro y el coeficiente de variación.

$$\bar{R} = \frac{(\sum R) \sum R}{N}$$

$$DE = \sqrt{N(\sum R^2) - (\sum r)^2}$$

$$CV = \left(\frac{DE}{\bar{R}} \right) 100$$

CONSTRUCCIÓN DE LA TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA.

Seguir el procedimiento que se realiza en linealidad del sistema.

EXACTITUD AL 100 %

1) Tabular los resultados del porcentaje recuperado \otimes , con base al siguiente formato:

R1,R2,R3,RN

2) Cálculos preliminares:

$$R = (\sum R)/N$$

$$DE = \left(\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right)^{1/2}$$

3) Cálculos finales:

Coefficiente de variación

$$CV = \left(\frac{DE}{R} \right) 100$$

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Procedimiento para evaluar la precisión del sistema de medición:

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

PROPIEDAD MEDIDA
(y)

2) Calcular la suma de la propiedad medida (SY), la suma de los cuadrados de la propiedad medida (Sy²) y determinar el número de mediciones (n).

$$Sy = \text{-----}$$

$$Sy^2 = \text{-----}$$

$$n = \text{-----}$$

3) Calcular el valor de la media aritmética (y) y de la desviación estándar de la propiedad medida con las siguientes ecuaciones:

$$y = \frac{Sy}{n}$$

$$s = \left(\frac{n(Sy^2) - (Sy)^2}{n(n-1)} \right)^{1/2}$$

4) Calcular el valor del coeficiente de variación (CV) con al siguiente ecuación:

$$CV = \frac{s}{y} 100$$

PRECISIÓN INTERMEDIA

En este caso se evaluó el efecto del analista sobre el método en diferentes días, se está observando el comportamiento del método con dos factores fundamentales.

Un método es reproducible en cuanto a los factores que se analizan y no en otros.

Para el caso particular del análisis con dos analistas en dos días diferentes y con tres realizaciones cada uno, se realiza un análisis de varianza que se describe a continuación.

El modelo hipotético que representa este caso es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j(i) + \epsilon_{K(ij)}$$

donde:

Y_{ijk} = Es el ensayo de la sustancia de interes (MELATONINA), de la K ésima muestra analizada por i ésimo analista, en el j ésimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interes (MELATONINA), de la muestra

α_i = efecto del analista en el ensayo
(donde $i = 1, \dots, a$)

$\beta_j(i)$ = efecto del día anidado del analista
(donde $j = 1, \dots, d$)

$\epsilon_{K(ij)}$ = error del método analítico
(donde $K = 1, \dots, r$)

a = número de analistas (donde $a = 2$)

d = número de días (donde $d = 2$)

r = número de replicaciones (donde $r = 3$)

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

Cuando se utilicen un número distinto de días y/o analistas y/o recobros por analista y día, se sugiere se consulte a un cambio en el estadístico.

1. Tabular los resultados con base en el siguiente formato:

DIA

ANALISTA 1

ANALISTA 2

1

2

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1		
2		

2. Cálculos preliminares

$y_{...} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$.

CALCULAR

$$\bar{Y} = \frac{Y_{...}}{N}$$

$$DE = \left(\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right)^{1/2}$$

3 Cálculos finales

Coefficiente de variación total.

$$CV = \left(\frac{DE}{\bar{Y}} \right) 100$$

4. Para establecer las fuentes de variación del método se necesita una estadística adicional para la prueba de precisión específicamente de la precisión intermedia.

4.1. Calcular la suma de las combinaciones: Analista-día (Y_{ij}), así como la suma para cada analista ($Y_{i..}$), la suma total de los datos ($Y_{...}$) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ($SSSY_{ijk}^2$):

$$\begin{array}{ll} Y_{1..} = & Y_{11.} = \\ Y_{2..} = & Y_{12.} = \\ Y_{...} = & Y_{21.} = \\ & Y_{22.} = \end{array}$$

$$SSS Y_{ijk}^2 =$$

4.2 Calcular la suma de los cuadrados del analista (SCa) con la siguiente ecuación:

$$SCa = (Sy_i^2 ..) / (dr) - (Y^2 ...) / (dra) =$$

Donde: r = Número de realizaciones
 d = Número de días
 a = Número de analistas

4.3 Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), por medio de la siguiente ecuación:

$$SCd = (SS Y_{ij.}^2) - (SS Y_{ij.}^2) / r$$

4.4 Calcular la suma de cuadrados del error (SCe), con la siguiente ecuación:

$$SCe = (SSSY_{ijk}^2) - (SSY_{ij.}^2) / r$$

CONSTRUCCIÓN DE LA TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

4.5 Con los datos anteriores, construir la tabla de Análisis de Varianza (ANDEVA).

TABLA DE ANDEVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F cri
Analista	$gla=a-1$	$SCa =$	$MCa=SCa/gla$	$Fa=MCa/MCd$	$Fgla,gld 0.05$
Día	$gld=(d-1)a$	$SCd =$	$MCD=SCd/gld$	$Fd=MCd/MCe$	$Fgld,gld 0.05$
Error	$gle=(r-1)ad$	$SCe =$	$MCE=SCe/gle$		

HIPOTESIS

A) H_0 : No importa el efecto del analista en un día determinado.

H_a : Si importa el efecto del analista en un día determinado

B) H_0 : El efecto del día de acuerdo al analista, es el mismo, es decir, es reproducible el análisis de acuerdo al día por un mismo analista.

H_a : El análisis no es reproducible de acuerdo al día que se realiza por un mismo analista.

4.6. Establecer las decisiones con base a las siguientes reglas:

Si $F_a \geq F_{gla, gld; 0.05}$ El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_a < F_{gla, gld; 0.05}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a \geq F_{gld, gle; 0.05}$ El método analítico no es reproducible en diferentes días por un mismo analista.

Si $F_a < F_{gld, gle; 0.05}$ El método analítico es reproducible en distintos días por el mismo analista.

4.7. La magnitud de la variación en el método analítico debido a los analistas, y entre los días por un mismo analista ; si el método no es reproducible por los analistas y/o entre días para un mismo analista, se calcula con las siguientes ecuaciones:

Variación interanalistas: $\pm ((M_{Ca} - M_{Cd}) / (r * d))^{1/2}$

Variación interdías para analista: $\pm ((M_{cd} - M_{Ce}) / (r))^{1/2}$

BIBLIOGRAFÍA

1. Anton-Tay, F. Díaz, J.L. y Fernández-Guardiola, G.; On the effects of melatonin upon human brains: its possible therapeutic implications. *Life Science*. 1971,10:841-850
2. Akerstedt, T. Gillberg, M. Wetterberg, L.; The circadian covariation of fatigue and urinary melatonin. *Biological Psychiatry*. 17:547-554.
3. Alcantara, A. Mora, J. Sánchez, J.; Material de apoyo del curso de validación de métodos analíticos impartido por SEBIOFAR, División de capacitación. México 1989
4. Arendt, J. Review: Melatonin. *Clinical Endocrinology*, 1988,29:205-229.
5. Arendt, J. Borbely, A.A., Francey, C. and Wright, J.; The effects of chronic, small doses of melatonin given in the late afternoon on fatigue in man: a preliminary study. *Neuroscience Letters*. 1984,45:317-321.
6. Ardent, J., and cols.; Some effects of melatonin and the control of its secretion in man. In *Photoperiodism, melatonin and the pineal*, Ciba foundation Symposium. Pitman, London. 1985,117:266-283.
7. Ardent, J.; Melatonin and circadian system. *Melatonin Clinical Perspectives* Ed. Miles a., Phibrick D.R., Thompson C. 1988, pp.43-6
8. Amrstrong, S.M., Cassone, V.M., Chesworth. M.J., Redman J.R. and Short. R.V.; Synchronization of mamalian circadian rytms by melatonin. *Jornal of Neural Transmition*. 1986,21:375-398.
9. Attanasio, A., Bombelli, M., Kuzmanovic, D. and Gupta, D.; The pineal influence on grow hormone secretion. *Neuroendocrinology Letters*. 1986,8:275-282.
10. Bahn, K., A., *Basic Medical Statistics*, Grune & Straton, New York and London, 1972
11. Barchas., et alt.; Acute pharmacology of melatonin. *Nature*. 1967,214:919-920.
12. Bowman, W., Rand, I. *Faramacología. Bases Bioquímicas y patológicas. Aplicacions clínicas*. 2a.Ed. Ed. Interamericana, México 1985.
13. Brzezinski, A., Lynch, H.J., Wurtman, R.J., and Siebel. M., M.; Possible contribution of melatonin to the timing of luteinizing hormone surge. *New England Journal of Medicine*. 1978,316:1550-1551.

14. Brzezinski, A. Seibel, M. M., Deug, M. H. and Wurtman, R.J.; Melatonin in human oreovulatory follicular fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1987,64:865-867.
15. Ebadi, M.; Regulation of the syntesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. In the *Pineal Gland* Raven Press New York. 1984,pp.1-38.
16. Cardinali, D.P., Ritta, M.N., Speziale, N., and et alt. ; Release and specific bindin of prostanglandins in bovine pineal glands . *Prostanglandins*. 1979,18:577-580.
17. Comitè de redaci3n de Guías Generales de Validaci3n, "Validaci3n", Méx.D.F. Capitulo 7: Coceptos generales, pp.7-9 Capitulo IV; Elementos de validaci3n de procesos, pp.11-14.
18. Crame, H., Rudolph,J., Consbruch, U., an et alt.: On the effects on human mood and performance. *Brain Research*. 1984,323:201-207.
19. Current concepts for validation of analytical methods of compendial assays. *Pharmacopeial forum*. Mar-Apr., 1986.
20. Feignbaum, A.; Control total de calidad. 2a. Ed. Ed. C.E.C.S.A. México D.F. Enero 1986 pp.512-549..
21. Fellenbrg, A.J., Phillipou, G., Semark, R.,F.; Urinary-6-sulphatoxymelatonin excretion and melatonin production rate: Studies in sheep and man. In *Pineal Function*. Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam. 1981,pp.143-150.
22. Foldes. A., Hasknson, R.,M., Sacaramuzi, R.,J. el alt. Modification os cheep sleep pineal beta adrenoceptor by some gonadal steroids but not by malatonin. *Neuroendocrinology*. 1983,37:378-385.
23. Foley, P.B., Cairncros,s K.D., and Foldes, A.; Pineal indoles: Significance and measurement. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1986,10:273-293.
24. Garfinkel, D., Laudon,M.,Zisapel and cols.: Improvement of quality in elderly people by cotrolled-release melatonin. *The Lancet*, 1995,346:541-544.
25. Garrido, V,F. Juárez, A.,J.; Parámetros Estadísticos y procedimientos de validaci3n, criterios de aceptaci3n, 2a. parte. *Pharma New*. 1990,1(6):15-20.
26. Guerra, J.; Validation on analytical methods by FDA laboratories. *Pharmaceutical Technology*. 1986,10(3):74-84.
27. Hokanson, C.; A life cycle approach to the validation of analyticals during pharmaceutical product development. Part 1. The initial method validation process. *Pharmaceutical Technology*

- 1994,18(9):118-130.
28. _____ A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development. Part. 11: Changes and the need for additional validation. *Pharmaceutical Technology* 1994,18(10):92-100.
29. Hoffman, R.A., Johnson, L.B., and Reiter, R.J.; Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *Journal of Pineal Research*. 1985,2:161-168.
30. Howard, C.A.; Dosage forms, in: *Introduction to Pharmaceutical* .ED. Lea and Febigen USA 1983.
31. Kveder,S., and Melssac,W.; The metabolism of melatonin (N-acetyl-5methoxytryptamine) and 5-Metoxitryptamine. *Jornal of Biological Chemistry*. 1961,236:3214-3220.
32. Klein, D.C., and Weller, J.L.; Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rythm in N-acetyltransferase. *Science*. 1970,169:1093-1905.
33. Lachman, L.; *Teory and practice of industrial pharmacy*. Ed. Lea and Febigen Philadelphia. 197
34. Lee, BJ, Parrot, K. A., Ayres, J. W., Sack, R.L.; Preliminary evaluation of transdermical delivery of melatonin in human subjets. *Res., Commun Mol. Pathol., Pharmacol*. 1994,85(3):337-46.
35. Lerner, A.B., Case, J.D., Takahasti y cols.; Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*. 1958,80:2587.
36. Lerner. A.B. Case, J.D.,Birman, R.V. Heinzelman, J.; Estructure of melatonin. *Journal of the American Chemical Society*. 1959:81,6084.
37. Lerner, A.B., and Nordlund, J.J.; Melatonin. *Clinical Pharmacology*. . *Journal of neural Trnsmision*. 1978,80:2587.
38. Lieberman, H.,R., Waldhauser, F., Garfield, G. and et alt.: Effects of melatonin on human mood and performance . *Brain Research*. 1984,323:201-207.
39. Lual, M.; Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. La exactitud del método analítico: El error sistemático constante. Segunda parte. *Pharma News*,1993, 173:24-25
40. Lovenberg, W., Jequier, E., Sjoerdsma, A.; Tryptopham hidroxylaton: measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. *Science*. 1967,155:217-219.
41. Macfarlane,J.,G., Cleghorn, J.M., Brown, G.,M. ancols. The effects of exogenous melatonin on the total sleep time on daytime alertness of chronic insommacs: a preleminary estudy.

Biological Psychiatry. 1991,30:371-376.

42. Marczynski, T.J., Yamaguchi, N., Ling, M., and col. ; Sleep induced by the administration of melatonin (5-metoxy-N-acetyltryptamine) to the hypothalamus in unrestrained cats. *Experientia*, 1964,20:435-437.

43. Martindale, The extra Pharmacopea, 28 th / 29 th. Pharmaceutical Press London. 1993/1993, pp. 202.

44. Matthews, C.,D., Kennaway, D.,J., Fellenberg, A.,J. and et al: Melatonin in man. *Advances in the Biosciences*. 1981,29:371-382.

45. Méndez, P.; Poggeler, B.; Reiter, R.J.; Barlow, W.; Pablos, M.; Nuclear localization of melatonin in diferent mammalian tissue inmunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell, Biochem*. 1993,53849:373-82.

46. Mocchegiani, E., Bulian, D., Santarelli, L., Tibaldi, A., Muzzioli, M., Lesnikov, V., Pierpaoli and Fabris, N.; The zinc pool is involved in the immune-recostituting effect of melatonin in pinealectomized mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*. 1996,277.,1200-1208.

47. _____The Zinc-Mlatonin Interrelationship . *Annals New York Academy of Sciences*. 1994,719:198-307.

48. Moore, R.Y.; Retinohypothalamic projection in mammals. 1960,52:153- 215.

49. Nash, R.A.;Process validadion for solid dosage forms, *Pharmaceutical, Technology*. June,1979:6,105-107.

50. Nordlund, J. J., and Lerner, A.B.; The effects of oral melatonin on skin colour and on the release

51. Papavasiliou, P.,S., Cotzias, G.C., DUBY,S.E.,Steck, A.J., Bell, M. and Lawrence, W.H.; Melatonin and Parkinsonism. *Journal of American Medical Association*. 1972,221:88.

52. Raynaud, F., Mauviard, F. Geoffriau, M., Pevet, P.; Plasma 6-hydroxymelatonin kinetics after melatonin administration to rats. *Bio., Signal*.1993,2(6):358-66.

53. Reiter, R.J.; Neuroendocrinology of melatonin. Clinical perspective. Miles A., Philbrick D.R.S. and Thomson C. (EDS.), Oxford Medical Publications 1988.pp.1-42.

54. Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos. Comité de elaboración de Guías ficiales de Validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Secretaria de Salud. México 1991.

55 Roman, D.F.; Inovación y desarrollo farmacéutico. Asociación Farmacéutica Mexicana.

- México D.F. 1990, pp.167-235.
56. Sánchez, S.F.; Manual de validación. México D.F.1991, pp.38-44.
57. Secretaría de Salud y Asistencia. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6a.Ed. S.S.A. México D.F. 1994.
58. Shibuya, H., Toru, M., and Wanatabe, S.; A circadian rhythm of triptophan hydroxylase in rat pineal. *Brain Research*. 1979,138:364-368.
59. Snith, J.,A., Barnes, J.,L., and Mee,T.,J.; The effect of neuroleptic drugs on serum and cerebrospinal fluid melatonin in psychiatric subjects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1979,31:245-248.
60. Sugden, D.; Psychopharmacological effects of melatonin mouse and rat. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1983,227:587-591.
61. The United States Pharmacopeia, 22 Ed. National Formulary 17 The Merk., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1990.
62. Vanecek, J., Pavlir, A., and Illnerova, L.; Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Research*. 1987,453:359-362.
63. Valadez, P.; Validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica., Programa de cursos de educación continua. Facultad de Química UNAM. 1996.
64. Valcan, R., Dirgutz, C., Azzario, C., Edwards, C.A., Dotti, C., Pag. M.,D., Portoll, I., and Scandlos, M.; Effects of oral administration of melatonin on GH responses to GRF in normal subjects. *Clinical Endocrinology*. 1987,26:453-458.
65. Yuwiler, A.; Vasoactive intestinal peptide simulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity: General Characteristics. *Journal of Neurochemistry*. 1983,41:146-153.
66. Waldhauser, F., Vierhapper, H. and Oirich, K.; Abnormal circadian melatonin secretion night-shift workers. *The New England Journal of Medicine*. 1986,315:1614.
67. Wayne, W., D., Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la Salud, 3ra. ed., Ed. Limusa, S.A. de C.V., Mexico, D.F., 1996.
68. Weichmann, A.F.; Melatonin: Parallels in pineal gland and retina. *Experimenta Eye. Research*. 1986,42:507-527.
69. Weissbach, H., Redfield, B.G., and Alexord, J., The enzymatic acetylation of serotonin and other naturally occurring amines. *Biochimica Biophysica Acta*. 1961,54:190-192

70. Wilkinson, M., Ardent, J., et al; Determination of dark-induced increase of pineal N-acetyltransferasa activity and simultaneous redioimmunoassay of melatonin in pineal serum and pituitary tissue of the male rat. *Journal of Endocrinology*. 1977:243-244.

71. Wurtman. et alt.; Melatonin, a Pineal Substance: Effect on the rat ovary. *Science*, 1963,141:277-278.