



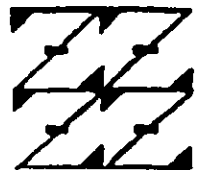
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE ACETATO DE CLORMADINONA Y
MESTRANOL EN ANTICONCEPTIVOS ORALES POR
ESPECTROSCOPIA DE FTIR

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ANA MARÍA GUTIERREZ LÓPEZ

DIRECTOR M. EN C. A. LOURDES CASTILLO GRANADA



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO D.F

ABRIL 2000

277971



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO

DE ESPECTROSCOPIA L-328 DE

LA F.E.S. ZARAGOZA

CAMPUS II

UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la profesora y mi directora:

M. en C. A. Lourdes Castillo Granada

Por haberme ayudado a concluir esta etapa mediante este trabajo y además por permitirme tratarla de manera profesional y personal.

A la profesora:

Biol Maricela Arteaga Mejia

Por motivarme con su gran fortaleza.

A mis sinodales.

Por la paciencia y comprensión brindadas

DEDICATORIAS

Doy gracias a Dios por todas las bendiciones que he recibido a lo largo de mi vida.

A mi Pachita y Don Rober mis queridos y adorados padres por ser como son y a los cuales les debo estar aquí. Quiero darles esto que parecía imposible para ustedes y para mí .

A mis ocho hermanos quiero agradecerles que me han ayudado siempre que los he necesitado:

A Lourdes por darle la sal y pimienta a la familia.

A Paty por ser tan desprendida y compartida.

A Vero por ser tan espléndida.

A Judy por su constancia.

A Cata por su alegría.

A Beto por su paciencia.

A David por su gran simpatía.

A Felipe por su inteligencia.

A mi esposo Hernán por ser el compañero y el amor de mi vida y por motivarme a concluir este objetivo muy personal

A mis tres adoraditos latosos: Carol, Hernán y Dana por darnos tanto amor a nosotros sus padres, a sus tíos y a los abuelos.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
A. El sistema genital femenino	3
a) Fisiología del ovario	3
b) Funciones del ovario	3
c) Hormonas Sexuales femeninas	3
d) La anticoncepción	4
B. Características de los principios activos	6
a) Acetato de Clormadinona	6
b) Mestranol	7
C. Espectrofotometría en el infrarrojo	8
a) Historia	8
b) Generalidades	8
c) Consideraciones teóricas	10
d) Características de un espectro	12
e) Instrumentación	13
1. Espectrofotómetro de IR Dispersivo	13
2. Espectrofotómetro de FTIR	13
f) Ventajas del espectrofotómetro FTIR contra el dispersivo	14
g) Análisis cuantitativo	16
1. Medidas de absorbancia en infrarrojo y su aplicación cuantitativa	17
D. Validación de métodos analíticos	18
a) Definiciones	18
1. Linealidad	18
2. Exactitud	18
3. Precisión	18
3.1 Repetibilidad	19
3.2 Reproducibilidad	19
4. Límite de detección	19
5. Límite de cuantificación	19
6. Especificidad	19
7. Estabilidad de la muestra	19

b) Determinaciones	19
1. Linealidad del sistema	19
2. Precisión	20
3. Linealidad del método	20
4. Exactitud y repetibilidad al 100%	20
5. Precisión (Reproducibilidad)	20
6. Especificidad para métodos de control de calidad	20
7. Estabilidad de la muestra analítica	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
IV. OBJETIVOS	23
V. HIPÓTESIS	24
VI. MATERIAL Y EQUIPO	25
A. Material	25
B. Reactivos	25
C. Equipo e instrumentos	26
VII. METODOLOGÍA GENERAL	27
A. Obtención del espectro para los compuestos I y II mediante la técnica de pastilla de KBr	27
B. Obtención del espectro en solución con CHCl_3	27
C. Espectro de la mezcla	27
D. Validación del método para la cuantificación de los compuestos I y II	27
a) Preparación del placebo	27
b) Preparación de la solución stock	27
c) Linealidad del sistema	27
d) Precisión del sistema	28
e) Especificidad	28
f) Linealidad del método	28
g) Exactitud y repetibilidad al 100%	28

h) Precisión (reproducibilidad)	28
i) Estabilidad de la muestra analítica	28
j) Límite de detección y cuantificación	28
VIII. RESULTADOS	29
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
X. CONCLUSIONES	49
XI . PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	50
XII. ANEXO	51
XIII. BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

La anticoncepción mediante el uso de hormonas esteroides se considera uno de los medios más eficaces para la regulación de la fecundidad en la mujer. En general, estos medicamentos incluyen en su formulación un progestágeno en combinación con un estrógeno y una tableta de estrógeno solo.

Para cuantificar hormonas en anticonceptivos en una formulación farmacéutica se han descrito varias técnicas entre las que se encuentran la fluorometría, colorimetría, cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y espectrofotometría en el Ultravioleta.

Haciendo uso de los avances tecnológicos, se desarrolló un método alternativo para cuantificar Acetato de Clormadinona y Mestranol sin separación previa mediante la técnica de Espectrofotometría en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR).

Ambos compuestos fueron extraídos de la forma farmacéutica con cloroformo. Se obtuvo el espectro de las sustancias puras y se eligió una banda característica para cuantificar cada uno de los compuestos; de la formulación se extrajeron los principios activos con cloroformo y se realizó la lectura de absorbancia del extracto y posteriormente se compararon las bandas elegidas con la curva de calibración de cada compuesto; las bandas fueron a 1732 cm^{-1} para Acetato de Clormadinona y 1605 cm^{-1} para Mestranol.

Puesto que es un requisito oficial y para garantizar la confiabilidad del método, se practicó la validación del mismo.

Los resultados obtenidos estadísticamente en el estudio de validación demostraron que el método es lineal, exacto, preciso (repetible y reproducible) y específico. La estabilidad máxima de la muestra es de 24 hrs.

Se concluyó que el método es confiable para cuantificar Acetato de Clormadinona y Mestranol sin separación previa en anticonceptivos orales como método de rutina en control de calidad.

Una de las grandes ventajas, es que al conocer los espectros en el Infrarrojo (IR) de los compuestos puros pueden identificarse contaminantes y/o productos de degradación.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace algunas décadas, el alto índice de natalidad, ha sido considerado como un problema que ha llevado a los gobiernos del mundo a implementar medidas para regular el crecimiento de la población. Son diferentes los medios de que se han valido para lograrlo, en la mayoría de los casos se han empleado métodos que no siempre son inocuos e incluso pueden atentar contra la salud de la población.

La anticoncepción mediante el uso de hormonas esteroides se considera uno de los métodos más eficaces para la regulación de la fecundidad en la mujer, a pesar de la falta de información de los riesgos que ello implica. Los anticonceptivos orales son drogas que poseen muchos efectos adversos, pero se usan por su efecto inmediato que es "evitar embarazos" (1, 2).

Todo medicamento tiene que cumplir con las especificaciones incluidas en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, las cuales establecen características de calidad (identidad, pureza, concentración e inocuidad), así como métodos de prueba y análisis que se deben aplicar a cada medicamento. Las características de calidad se agrupan en físicas, biológicas y químicas; para éstas últimas, se aplican métodos analíticos que permiten determinar la concentración del fármaco o sustancias relacionadas (3).

El avance tecnológico ha dado lugar al desarrollo de métodos instrumentales para el análisis cualitativo y cuantitativo entre ellos está la espectrofotometría Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR) .

La ley general de salud exige como requisito de las autoridades gubernamentales, la validación de métodos analíticos como parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación, así como de las técnicas de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas, donde el químico se da cuenta si el estudio, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado (4).

En el presente trabajo se desarrolló y validó el método analítico para la cuantificación de Acetato de Clormadinona y Mestranol por (FTIR). Se realizó la extracción de ambos principios activos con Cloroformo y se cuantificaron comparando las lecturas de absorbancia con las de referencia.

En el estudio de validación, el método mostró ser lineal, exacto, preciso y específico. La estabilidad máxima de la muestra es de 24 hrs., por lo que debe analizarse el mismo día de su preparación.

II.FUNDAMENTO TEÓRICO

A. EL SISTEMA GENITAL FEMENINO

a) *Fisiología del ovario*

El sistema reproductor de la mujer comprende, como carácter sexual primario al ovario y como principales órganos sexuales secundarios las trompas, útero y vagina.

Estructura del ovario.

- Folículo de Graaf. El ovario está revestido de un epitelio germinativo, cuyas células se invaginan formando los cordones Pfluger, de los que se forman los folículos primordiales; una de las células se desarrolla y se transforma en óvulo, mientras que las demás forman la zona granulosa. Durante la primera infancia, los folículos primordiales crecen pero no maduran; en la pubertad, comienza a producirse la maduración a razón de un folículo por mes.
- Ovulación. El folículo aumenta su contenido líquido y luego se rompe, liberando el óvulo, que cae en el peritoneo y es recogido por la trompa.
- Cuerpo amarillo. Durante la ruptura del folículo, se produce una pequeña hemorragia, la sangre llena la cavidad folicular y se coagula formando el cuerpo hemorrágico; luego, la granulosa y la teca interna, proliferan, diferenciándose grandes células epiteliales luteínicas y tecales que reemplazan al coágulo sanguíneo y que forman el cuerpo lúteo que persiste hasta la próxima menstruación (5,6).

b) *Funciones del ovario*

El ovario posee dos funciones fundamentales:

- Formación del óvulo o Función Gametogénica.
- Función endocrina. Secreción interna de estrógenos, esencialmente estradiol (formando el tejido folicular) y progesterona (producida por el cuerpo amarillo).

Como funciones secundarias se consideran: el desarrollo del útero, trompas y vagina, disposición femenina de la grasa, pelo pubiano, ciclo menstrual, preparación del útero para la preñez; desarrollo de la glándula mamaria y su preparación para la secreción láctea (5, 6).

c) *Las hormonas sexuales femeninas.*

Clasificación de las hormonas sexuales femeninas:

- **Estrógenos.** Se denomina así a las sustancias que son capaces de provocar el estro y producir las características femeninas; algunas son naturales y derivan del ovario; como el restradiol, estrona y estriol, las de origen sintético son etinil estradiol, mestranol y quinestrol entre otros.
- **Antiestrógenos.** Son sustancias que tienen la propiedad de inhibir la acción de los estrógenos
- **Progestágenos.** Término que se aplica a las sustancias capaces de producir en el endometrio, los cambios necesarios para permitir la implantación o nidación del huevo. Pero al mismo tiempo, tienen la propiedad de inhibir la ovulación, por lo que también se les denomina anovulatorios. Por su origen, se clasifican en dos grupos: los derivados del pregnano (la progesterona y sus derivados) y los derivados del androstano (19-noresteroides).

La terapéutica sustitutiva de la secreción interna de los ovarios se efectúa con las hormonas sexuales femeninas que comprenden dos grupos esenciales:

- Los estrógenos, que se forman naturalmente en especial en el folículo de Graaf.
- Los progestágenos, especialmente progesterona y derivados que se forman esencialmente en el cuerpo amarillo. Estos últimos tienen la prioridad de suprimir la ovulación (anovulatorios).

d) La anticoncepción

La anticoncepción mediante el uso de hormonas esteroides se considera uno de los medios más eficaces para la regulación de la fecundidad en la mujer. En general, estos medicamentos incluyen en su formulación un progestágeno (Acetato de Clormadinona) y un estrógeno (Mestranol) en combinación, y una tableta de estrógeno solo (1, 7).

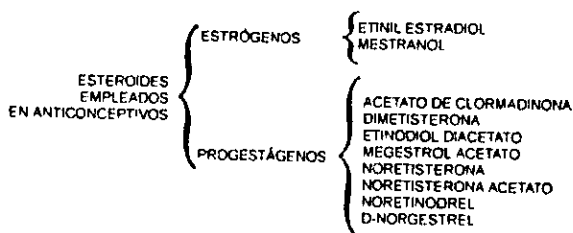


Figura No. 1 Clasificación de los esteroides empleados en anticonceptivos.

En la práctica, la administración oral de una tableta combinada de un progestágeno y un estrógeno por 21 días consecutivos, recibe el nombre de terapéutica combinada, con la cual se obtiene un tratamiento anticonceptivo, que sigue el esquema más parecido al curso de la secuencia hormonal ovárica cíclica; los cambios que se indican en endometrio y vagina semejan estrechamente a los que se observan en las fases proliferativas y secretora del ciclo normal, y la duración y el volumen del sangrado menstrual, se mantienen dentro de los límites normales. El Mestranol es un estrógeno 100% eficaz para inhibir la ovulación al frenar la secreción hipofisaria; la Clormadinona produce una transformación secretora del endometrio (8).

Actualmente en México, la mezcla de estos compuestos es elaborada para su comercialización por el laboratorio Syntex y una de las presentaciones se distribuye con el nombre de Secuentex 21 con estrógenos.

En la quinta edición de la Farmacopea Nacional se describen los métodos para cuantificar el Acetato de Clormadinona y el Mestranol por separado. Pero no se cuenta con un método que permita cuantificarlos sin separación previa (9).

En la sexta edición de la Farmacopea Nacional, se plantean técnicas diferentes para la cuantificación de cada compuesto. Para el Acetato de Clormadinona se usa la Colorimetría; mientras que para el Mestranol se emplea la Cromatografía del Líquidos (10).

B. CARACTERISTICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

a) Acetato de Clormadinona (I)

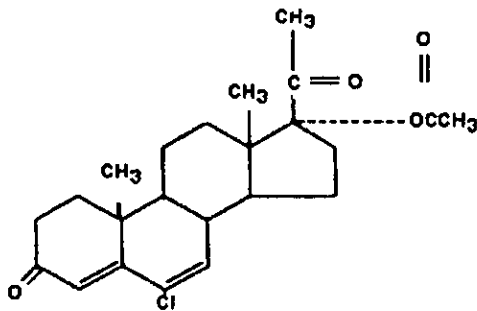
17-(Acetyloxi)-6-cloro-pregna-4,6-dien-3,20 diona

$C_{27}H_{32}ClO_4$

PM = 404.94 g/ mol.

Cristales blancos. Punto de fusión 212-214°C. U.V. max (cloroformo) 283.5, 286 nm, soluble en Cloroformo (11).

Propiedades farmacológicas: produce efectos progestacionales semejantes a los de la progesterona. Impide el embarazo por los mecanismos de inhibición de ovulación impidiendo la secreción de gonadotrofinas y aumento de viscosidad de la secreción endocervical, impidiendo la penetración de los espermatozoides a la cavidad uterina, atrofiando el endometrio e impidiendo la nidación.



b) Mestranol (II)

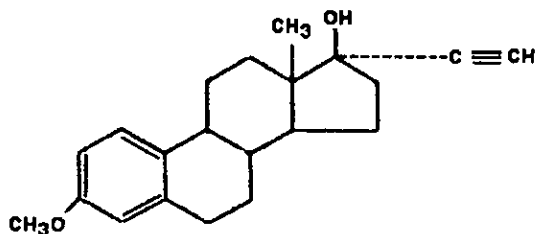
(17 α)-3-metoxi-19-norpregna-1,3,5,(10)-trien-20-in-17-ol).

C₂₁ H₂₆ O₂

PM= 310.42 g/mol.

Polvo cristalino blanco o blanco cremoso, inodoro, punto de fusión 150-151°C. U.V. max (metanol) 279,287 nm completamente soluble en Cloroformo, poco soluble en éter y en alcohol, insoluble en agua (11,12).

Propiedades farmacológicas: el Mestranol es el más activo de los preparados orales conocidos. Comparte las acciones de todos los estrógenos y se le utiliza principalmente en mezclas de anticonceptivos orales que inducen el flujo menstrual con su administración y consecuente retiro. El Mestranol necesita para su completa función biológica, la acción de la progesterona o algún progestágeno; ambos, suprimen la acción de las hormonas foliculo estimulante y luteinizante (efecto menos consistente), y suprimen la ovulación al inhibir el estímulo ovulatorio.



C. ESPECTROFOTOMETRIA EN EL INFRARROJO

a) Historia

En 1800, Herschel investigó el efecto del calentamiento sobre la materia de diferentes partes del espectro electromagnético y descubrió que la región del rojo tenía un efecto notable. En 1910, Coblenz realizó los espectros de absorción para varios compuestos. De esta manera estableció las bases para algunas correlaciones que aún se manejan, los instrumentos empleados en esa época eran muy rudimentarios comparados con los actuales. Sin embargo, durante la guerra (1939 a 1945) las aplicaciones de la espectroscopía en el infrarrojo, particularmente en el análisis cualitativo de mezclas de hidrocarburos empleadas como combustible, permitieron que las investigaciones en esta área fueran importantes. En 1913 se disponía comercialmente de un instrumento de poca calidad, fabricado por la compañía Adam Higler, Ltd.; en 1938, cerca de 15 instrumentos ya operaban en Estados Unidos, y para 1947, más de 500. Beckman presentó su primer instrumento en 1942 y Perkin Elmer en 1944.

A partir de estas fechas, el crecimiento de esta técnica de análisis instrumental fue explosivo. Los cambios e innovaciones en los instrumentos y en la manipulación de muestras la hacen, una técnica de gran versatilidad.

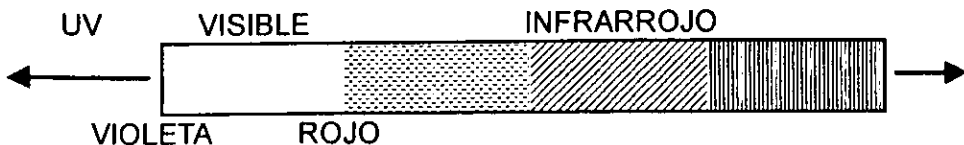
b) Generalidades

La interacción del Espectro electromagnético con la materia se fundamenta en la relación existente entre la energía de la radiación y la frecuencia o su longitud de onda. Por consiguiente, es posible distinguir diferentes zonas energéticas a las que corresponden diferentes espectros atómicos o moleculares que son la representación gráfica o fotográfica de la distribución de intensidad de la radiación electromagnética, emitida o absorbida por una muestra en función de la longitud de onda o frecuencia de dicha radiación. De esta representación, es posible obtener información detallada sobre la estructura de las moléculas, simetría molecular, distancias de enlace, ángulo de enlace, distribuciones electrónicas, fuerzas de enlace, procesos intra e intermoleculares (19, 20, 21).

La espectroscopía en el infrarrojo estudia la interacción de la radiación infrarroja con la materia. El espectro en el infrarrojo de un compuesto proporciona información importante acerca de la estructura molecular (13, 14).

La espectroscopía en el infrarrojo encuentra su gran campo de aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas orgánicas, se usa cada vez más en el estudio de moléculas inorgánicas poliatómicas y para compuestos organometálicos (2, 13, 15, 16, 17).

La región infrarroja del espectro electromagnético está comprendida en el intervalo de longitud de onda de 770 nm a 1000 μ . Figura No. 2 (16, 17).



λ : Å	2000	4000	8000	2×10^6
λ : nm	200	400	770	1×10^5
λ : μ m	0.2	0.4	0.77	1000
$\bar{\nu}$:	5000	25000	12900	10 cm^{-1}

Figura No. 2 Sección del espectro electromagnético

Es usual emplear como unidades de referencia los valores de longitud de onda λ o de número de onda $\bar{\nu}$ expresado en cm^{-1} , este valor es el inverso de λ en cm.

$$\bar{\nu} = 10^7 / \lambda, \text{ si } \lambda = \mu\text{m}$$

La región infrarroja a su vez se subdivide en tres:

INFRARROJO CERCANO	770 nm – 2.5 μ m 12900 – 4000 cm^{-1}
INFRARROJO MEDIO	2.5 – 50 μ m 4000 – 200 cm^{-1}
INFRARROJO LEJANO	50 – 1000 μ m 200 – 10 cm^{-1}

Los espectros en el infrarrojo son un conjunto de bandas que no siempre se pueden asignar todas ellas, sin embargo las bandas que se asignan proporcionan importante información estructural acerca de los grupos funcionales presentes en la molécula. Actualmente con la introducción de instrumentos modernos y con sistema de registro computarizado se hace mas versátil el empleo tanto en análisis cualitativo como cuantitativo.

c) Consideraciones teóricas.

La energía total de una molécula viene dada por la contribución de varias energías:

- Energía electrónica
- Energía vibracional
- Energía rotacional

Cada una de estas involucra los cambios correspondientes y están cuantizados. La energía electrónica esta asociada a los cambios en los electrones externos de la molécula, la energía vibracional es la energía de la molécula considerada por las vibraciones interatómicas, el último término se refiere a la energía asociada a la molécula alrededor de su centro de gravedad. Los cambios vibracionales producen un espectro definido en la región IR.

Las vibraciones fundamentales pueden ser longitudinales (Stretching) y de deformación (Bending), las primeras no alteran el eje ni los ángulos de enlace a diferencia de las vibraciones de deformación que requieren más energía (2, 13, 16).

Las vibraciones longitudinales o stretching pueden ser aisladas, acoplada simétrica y acoplada asimétrica Figura No. 3

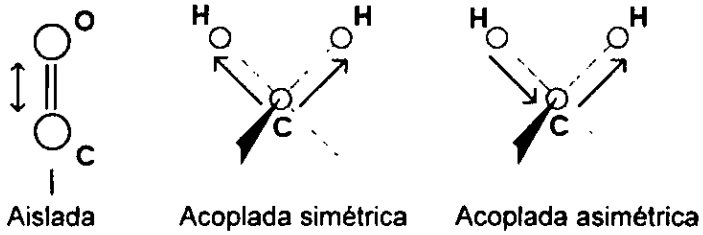


Figura No.3 clasificación de las vibraciones longitudinales o stretching

Las vibraciones de deformación o bending se clasifican en: "en fase", "balanceo", "torsión" y "tijera". Figura No. 4

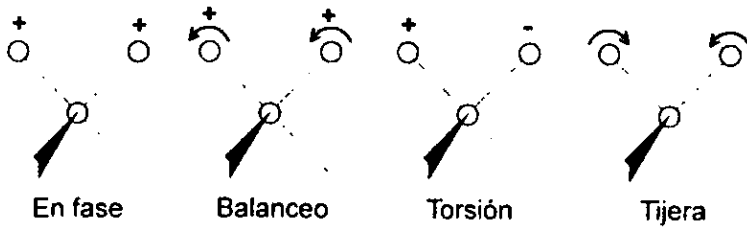


Figura No. 4 clasificación de las vibraciones de deformación de bending

Las vibraciones se rigen por la ley del movimiento armónico simple, la relación entre la frecuencia de la vibración, la fuerza de la unión y la masa atómica, está dada por:

$$\bar{\nu} = (1/2\pi C) (K/m^*)^{1/2}$$

$$m^* = m_1 m_2 / m_1 + m_2$$

$\bar{\nu}$ = No. de onda de la banda de vibración.

C = Vel. de la luz.

m^* = Masa reducida de los átomos involucrados.

K = Cte. de fuerza del enlace.

Como consecuencia la espectroscopía en el IR, permite distinguir a un grupo funcional de otro y proporciona las características estructurales más importantes de un compuesto (2, 13, 16).

d) Características de un espectro

El espectro de un compuesto es la representación gráfica de la longitud de onda o de la frecuencia, cambiando continuamente en una pequeña porción del espectro electromagnético contra la transmitancia (%T) o absorbancia (A).

$\%T = \text{intensidad} / \text{intensidad original} (100)$

$A = \log (\text{intensidad original} / \text{intensidad})$

Los espectros en el infrarrojo, registran la longitud de onda o la frecuencia contra %T. La absorción de radiación a una longitud de onda dada, origina un descenso en el %T, lo que se pone de manifiesto en el espectro como una banda de absorción. La porción del espectro donde %T es 100 o cerca de 100 se llama línea base, la cual se registra en la parte superior (14).

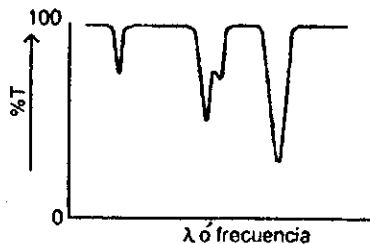


Figura No. 5 Características de un espectro

e) Instrumentación.

Los instrumentos empleados para el análisis por infrarrojo son de dos tipos: dispersivos y los que emplean las transformadas de Fourier para la obtención del espectro correspondiente. Estas dos clases de instrumentos nos proporcionan el espectro en el IR de una muestra determinada, la interpretación final es la misma a pesar de que los instrumentos modernos nos ofrecen más ventajas (15).

1. Espectrofotómetro de IR-Dispersivo

Los componentes básicos (19, 20, 21) que caracterizan a este tipo de espectrofotómetros son:

- **Fuente de radiación**
 - ✓ Filamento de Nerst
 - ✓ Globalar
 - ✓ Bobina de Nichrome

- **Región para la muestra**
 - ✓ Doble haz

- **Sistema dispersivo**

Monocromador (separa la radiación en sus diferentes longitudes de onda a través de una rejilla de difracción).

- **Detector**
 - ✓ Bolómetro
 - ✓ Termopar
 - ✓ Detector neumático de Golay

- **Sistema de registro**

2. Espectrofotómetro de IR-Transformadas de Fourier

La espectroscopía infrarroja basada en transformadas de Fourier, difiere de la espectroscopía convencional principalmente en que, las intensidades de todas las frecuencias son muestreadas al mismo tiempo.

El espectrofotómetro IR por transformadas de Fourier (FTIR) es llamado así porque en lugar de dispersar la luz, utiliza un interferómetro del que se obtiene una señal llamada interferograma y que por medio de una computadora, utilizando como herramienta las ecuaciones de Transformadas de Fourier, es convertida en un espectro (2, 13, 15, 24).

Principales componentes de un FTIR (21,25)



▪ Fuente de radiación

- ✓ Lámpara de Nerst (Zirconio, Itrio, Torio)
- ✓ Lámpara de Globar (carburo de silicio)
- ✓ Bobina de Nicromel (cromo y níquel)

▪ Interferómetro de Michelson

- ✓ Divisor de haz de radiación (transmite un 50 % y refleja otro 50%) cuando se recombinan los haces, se obtiene un patrón de interferencia conforme varía la diferencia de la trayectoria.

▪ Detectores

- ✓ Sulfato de triglicina deuterado (DTGS) respuesta más rápida que el termopar.
- ✓ Mercurio-cadmio-telurio (MCT). Es un foto detector que opera con nitrógeno líquido, tiene mejor respuesta que el DTGS, recomendable para muestras algo opacas.
- ✓ Tantalato de litio (LiTaO). Es menos sensible que el DTGS y de bajo costo.

- **Sistema de procesamiento de datos.** Usa una computadora capaz de realizar las operaciones matemáticas de Transformadas de Fourier.

f) Ventajas del espectrofotómetro de FTIR contra el Dispersivo

1. Espectrofotómetro FTIR

- VENTAJAS MÚLTIPLES (VENTAJAS DE FELLGETT)
Se miden en forma simultánea todas las frecuencias
✓ Mayor rapidez (mayor número de barridos)

- VENTAJA DE JAQUINOT
- ✓ El 95% de la energía de la fuente de radiación se aprovecha (no hay rendijas)
- ✓ Misma relación señal -ruido

- VENTAJA DE CONNES
- ✓ Usa un rayo laser Helio-Neón para fijar la longitud de onda
- ✓ Da una calibración de 0.01 cm⁻¹

- VENTAJA DE RESOLUCIÓN
- ✓ Resolución constante en todas las longitudes de onda
- ✓ Continuidad en el espectro

- VELOCIDAD
- ✓ La electrónica que utiliza tiene una respuesta de segundos.
- ✓ Debido a la rapidez, se puede adaptar un cromatógrafo de gases

- VENTAJAS DE OPERACION
- ✓ Capacidad de memoria para guardar de 3 a miles de espectros, según se amplíe la memoria de la computadora.
- ✓ Puede hacer uno o más barridos de fondo (background).
- ✓ Puede hacer la diferencia de espectros, que es de gran ayuda para el análisis cuantitativo y cualitativo.

- VENTAJA DE LA LINEA RECTA
- ✓ Esta ventaja es útil para realizar análisis cuantitativo, dado que cada una de las frecuencias de IR son moduladas por el interferómetro.

- SIMPLIFICIDAD MECANICA.
- ✓ Los instrumentos de FTIR tienen sólo una parte móvil, lo cual disminuye el riesgo de que haya desajustes.

- NO CALENTAMIENTO DE LAS MUESTRAS (2, 15, 21,22, 25).

2. Espectrofotómetro dispersivo.

- Se miden sucesivamente las frecuencias.
- Un sólo barrido.
- Solo el 10% de la fuente de radiación se aprovecha

- Usa una rendija con menor poder de resolución
- La resolución varía por las rendijas
- Hay discontinuidad por la rejilla y los filtros
- Instrumento discontinuado

g) Análisis cuantitativo

La espectroscopía IR se ha utilizado comúnmente como método de rutina en el análisis cualitativo de grupos funcionales, sin embargo, no debe ignorarse su aplicación cuantitativa. En general puede realizarse análisis cuantitativo en fase sólida, líquida o gaseosa.

La cuantificación de un solo componente en una mezcla puede efectuarse por comparación de la intensidad de una banda característica de ese compuesto, con las intensidades de la banda a esa misma frecuencia del componente pero medidas a diferente concentración. Para el análisis de mezclas lo único que se requiere es una banda de absorción para cada uno de los componentes, de intensidad apreciable y que no se interponga con la de otros en la muestra total.

El análisis cuantitativo IR se fundamenta en la ley de Lambert y Beer, que se basa en la intensidad relativa de luz que llega al detector o el porcentaje de transmisión de la radiación incidente al pasar por la muestra.

Dependiendo de las unidades de medida esta ley puede ser escrita en una variedad de formas (10, 20, 24):

La relación más usual: $A = abc$, nos indica que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes

A = absorbancia

c = concentración en gramos por litro

b = ancho de la celda en cm

a = $\epsilon/P.M.$ = absortividad molar que es una constante de proporcionalidad y es característica del compuesto para esa absorción particular.

e = absortividad molar o coeficiente de extinción molar. Esta es una característica de la muestra a una frecuencia particular. Esta es casi la misma para un grupo de compuestos si la banda de absorción es característica de ese grupo.

El procedimiento para la cuantificación de un componente, es la medida de la absorbancia a diferentes concentraciones del compuesto puro, para construir una curva de calibración absorbancia contra concentración. La absorbancia del compuesto problema se obtiene por interpolación (13, 15, 16, 26).

1. Medidas de la absorbancia en infrarrojo y su aplicación cuantitativa.

El método de la línea base, consiste en dibujar una línea para representar la línea base de la banda de absorción. Como se observa en la figura No. 6. La línea base representativa puede dibujarse de varias maneras, dependiendo de la forma de la señal seleccionada. Este método tiene las siguientes ventajas:

- La absorción de la celda y otras absorciones no relacionadas con la banda en estudio se hacen mínimas.
- La recopilación de datos experimentales es rápida.
- Los cálculos numéricos son sencillos y rápidos.

En la elección de la línea base se debe considerar:

- Si no existen sustancias perturbadoras, se dibuja la línea 1.
- Si existe una sustancia perturbadora, cuya interferencia se encuentre del lado de mayor longitud de onda, se dibuja la línea 2.
- Si la interferencia se encuentra del lado de menor longitud de onda, se dibuja la línea 3.
- Si la banda perturbadora se encuentra cerca de la banda analítica, pero su efecto es constante sobre el intervalo de análisis, se puede aplicar la línea 4.
- Cuando la transmitancia del disolvente es constante o al menos combina linealmente entre los hombros de la banda analítica se puede aplicar la línea 5 ó 6.

En este método se toma en cuenta la reproducibilidad relativa del punto o puntos desde los cuales se construye la línea base. Las desviaciones provienen de efectos instrumentales o químicos (15, 22, 25, 27).

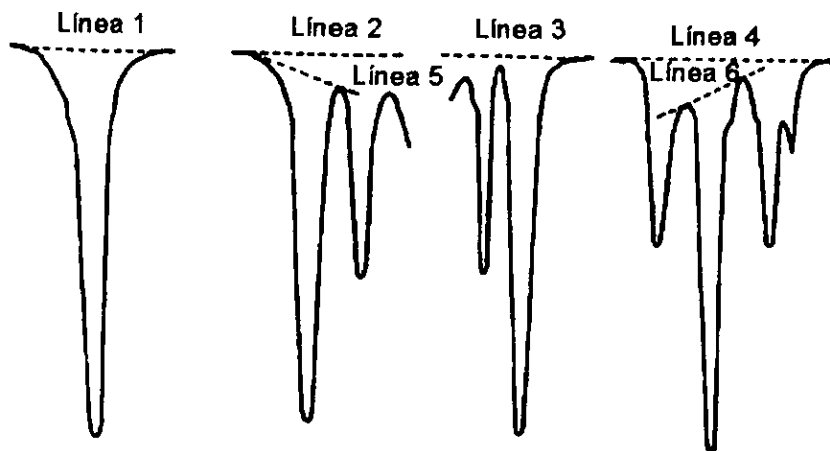


Figura No. 6 Ejemplos de construcciones posibles de "línea base"

D. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

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, proporcionando una medida del comportamiento del método.

La validación del método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas (4).

a) Definiciones

1. Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

2. Exactitud: La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas del compuesto a cuantificar.

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

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

3.2 Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes (distintos analistas, distintos días, mismo u otros laboratorios, mismos u otros instrumentos, etc.)

4. 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. Se le asigna el valor de 3σ (σ =desviación estándar).

5. Límite de cuantificación: Es la menor concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser determinada con precisión aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas. Se considera el valor de 10σ .

6. 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.

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

b) Determinaciones

1. Linealidad del sistema: Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones dependerá del propósito del método.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

$$CV \leq 1.5$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

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

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

$$CV \leq 1.5\%$$

3. Linealidad del método: Se determina a partir de solución estándar adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

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

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

CRITERIO DE ACEPTACION

$$m \sim 1$$

$$b \sim 0$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$\bar{R} = 97 - 103 \%$$

$$CV \leq 3 \%$$

4. Exactitud y repetibilidad al 100 %: Se determina de cuando menos, 6 placebos adicionados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 % utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

El % recuperado y el CV deberán estar de acuerdo con el criterio de linealidad del método

$$\bar{R} = 97 - 103 \%$$

$$CV \leq 3 \%$$

5. Precisión (reproducibilidad). Se determina de una muestra homogénea del producto cercano al 100 % de la concentración teórica analizada cuando menos por dos analistas, dos días diferentes y por triplicado.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

$$CV \leq 3 \%$$

6. Especificidad para métodos de control de calidad. Con el método propuesto:

- Analizar placebos del producto
- Identificar la (s) respuestas (s) del (los) activo (s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

7. Estabilidad de la muestra analítica: Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

CRITERIO DE ACEPTACION

La muestra es estable si el IC para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda de $\pm 2 \%$

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación de los principios activos en anticonceptivos orales, en general, es realizada por las siguientes técnicas:

- Fluorimetría
- Colorimetría
- Cromatografía de líquidos
- Espectrofotometría U. V.

Incluso algunas son comparadas con respecto a otras para destacar sus ventajas (28, 29, 30, 31).

En la 6a. edición de la Farmacopea Mexicana se describe la cuantificación de Acetato de Clormadinona (I) y Mestranol (II) en tabletas, de manera independiente, y con técnicas diferentes; la primera es por colorimetría y la segunda, por cromatografía de líquidos. Ninguna de las farmacopeas extranjeras incluye la evaluación de ambos principios activos en la misma formulación, por lo cual, se ve la necesidad de desarrollar un método analítico para tal fin.

Las técnicas citadas para la cuantificación de los compuestos I y II involucran manipulación excesiva, aunada a que se emplean técnicas diferentes, lo que impide que se puedan cuantificar a la vez.

Pensando en lo anterior y considerando que ambas estructuras son similares pero difieren en ciertos grupos funcionales, resulta muy apropiada la técnica por IR, que aunque se emplea regularmente para la identificación de grupos o compuestos puede utilizarse también para cuantificar dos compuestos sin separación previa e incluso cuantificarlos a la vez, ya que muestran diferentes bandas que siguen la ley de Lambert-Beer cuya absorbancia es proporcional a la concentración (2).

La obtención del espectro en el IR permite observar continuamente las absorciones características de la molécula y determinar si sufrió degradación en sus grupos funcionales.

IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico para control de calidad por FTIR para la cuantificación de Acetato Clormadinona (I) y Mestranol (II), presentes en una formulación farmacéutica.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar experimentalmente bandas de absorción del espectro de IR para cada uno de los fármacos que no se superpongan.
- Determinar el disolvente adecuado para la extracción de los principios activos presentes en la Formulación.
- Determinar linealidad, repetibilidad, exactitud, precisión y reproducibilidad para validar el método analítico, evaluando al sistema y al método.

V. HIPÓTESIS

Dado que la intensidad de las bandas de absorción en espectroscopía IR por comparación con una curva estándar da información acerca de la concentración; la medición de las mismas permitirá cuantificar al Acetato de Clormadinona (I) y Mestranol (II) que se encuentran presentes en tabletas anticonceptivas.

VI. MATERIAL Y EQUIPO

A. MATERIAL

- Mortero de ágata con pistilo
- Tubos de ensayo
- Embudo de separación
- Embudo de filtración tallo corto Pyrex
- Pipetas Pasteur
- Pipetas volumétricas Pyrex de 1, 2, 3 y 4 ml.
- Soporte universal
- Anillo
- Matraz aforado Pyrex de 10, 25 y 250 ml.
- Matraz Erlenmeyer Pyrex de 125 ml
- Rejilla
- Espátula
- Jeringas
- Papel glassine

B. REACTIVOS

- Acetato de Clormadinona Syntex
- Mestranol Syntex
- Sulfato de sodio anhidro Merck
- Cloroformo Merck R.A.

- Bromuro de potasio Merck
- Tabletas de secuentex 21 (con la mezcla de los compuestos I y II)

C. EQUIPO E INSTRUMENTOS

- Espectrofotómetro Perkin Elmer 1600 serie FTIR
- Balanza Analítica Mettler
- Parrilla de agitación y calentamiento Barnstead/ Thermolyne.
- Prensa hidráulica

VII. METODOLOGÍA GENERAL

A. OBTENCIÓN DEL ESPECTRO PARA LOS COMPUESTOS I y II MEDIANTE EL MÉTODO DE PASTILLA DE KBr.

Se homogenizaron 100 mg de KBr anhidro en un mortero de ágata. Se adicionaron 3 mg del compuesto I, se pulverizó y comprimió a una presión de 1400 a 4500 kg/cm² para obtener la pastilla. Se obtuvo el espectro correspondiente. Se repitió el procedimiento para el compuesto II.

B. OBTENCIÓN DEL ESPECTRO EN SOLUCIÓN CON CHCl₃

Se colocaron 0.3 mg del compuesto I, se aforó a 10 ml con CHCl₃, inicialmente se corrió la absorción de fondo con CHCl₃, y posteriormente se obtuvo el espectro de la solución del espectro I. La determinación se hizo en una celda para líquidos. Se repitió el mismo procedimiento para el compuesto II.

C. ESPECTRO DE LA MEZCLA

Se tomó 1 ml de cada una de las soluciones de los compuestos I y II indicados en B. Se mezclaron y se procedió a obtener su espectro. Inicialmente se corrió la absorción de fondo con CHCl₃, posteriormente se obtuvo el espectro de la mezcla.

D. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS I Y II.

a) Preparación del placebo.

Se pesaron y pulverizaron 10 tabletas (con la mezcla de los compuestos I y II). Se colocó el polvo en un matraz erlenmeyer, se adicionaron 50 ml de cloroformo, se agitó durante 5 min., se filtró por gravedad, el filtrado se recibió en un matraz aforado de 250 ml, se realizaron 3 lavados más con volúmenes de 50 mL de cloroformo, se aforó con CHCl₃. Esta solución se empleó como placebo.

b) Preparación de la solución stock

Se pesaron 250 mg del compuesto I y 250 mg de compuesto II, se colocaron ambos en un matraz aforado de 25 ml, se aforaron con el placebo (concentración final 10mg/mL). Esta solución se empleó para la obtención de los parámetros del método. Una solución similar se preparó y se aforó con CHCl₃ para la determinación de los parámetros del sistema.

c) Linealidad del Sistema

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs absorbancia) por duplicado, utilizando las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 3, y 4 mg/mL para el compuesto I y el compuesto II.

d) Precisión del Sistema

Se consideró la concentración de 2 mg/mL como el 100% para cada uno de los compuestos.

Se determinó por el análisis sextuplicado de una solución cuya concentración es igual a 2 mg/mL, para cada compuesto por separado, obteniendo los valores de absorbancia correspondientes.

e) Especificidad

Se analizó la respuesta de los excipientes suspendiéndolos en Cloroformo.

f) Linealidad del método

Se determinó a partir del placebo adicionado con 50, 100 y 150 % de cada uno de los principios activos, el análisis se realizó por triplicado para cada concentración (tomando como 100% la concentración de 2 mg/mL), obteniendo los valores de absorbancia correspondientes a cada concentración.

g) Exactitud y Repetibilidad del Método.

Se determinó a partir de seis placebos adicionados de manera independiente (considerando la concentración de 2mg/mL como el 100%) para el compuesto I y II. El análisis se desarrolló bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

h) Precisión (reproducibilidad) del método.

Se determinó a partir de una muestra homogénea cercana al 100% (2 mg/mL), se realizó por dos analistas en dos días diferentes por triplicado para ambos compuestos.

i) Estabilidad de la muestra analítica.

Se determinó mediante la comparación de los resultados obtenidos de los análisis iniciales de tres muestras de ambos compuestos, con los resultados de las mismas muestras después de permanecer 24 y 48 hrs. a temperatura ambiente y en refrigeración. Se realizaron bajo las mismas condiciones de operación, usando una solución de referencia recién preparada para cada tiempo de acuerdo a lo establecido en el método analítico.

j) Límite de Detección y Cuantificación.

Se preparó una solución cuya concentración fue de 2 mg/mL para cada compuesto, leyéndose la absorbancia veinte veces. Se repitió el procedimiento para el compuesto II.

VIII. RESULTADOS

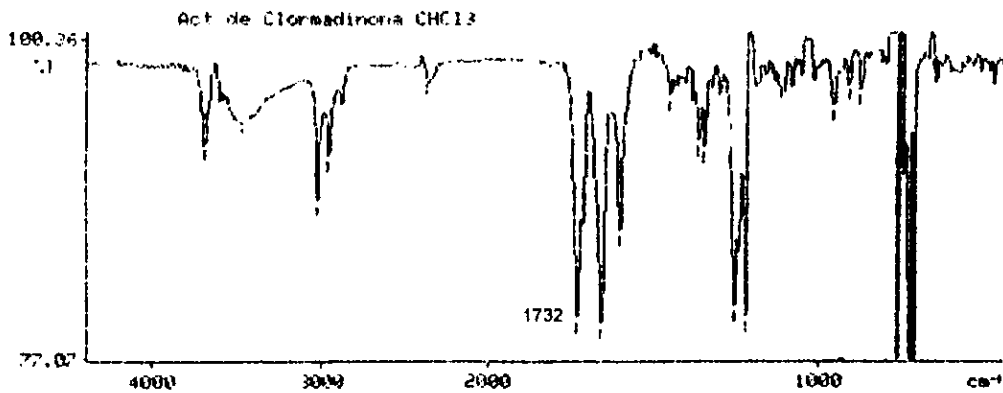


Figura No. 7 Espectro del compuesto I en CHCl_3

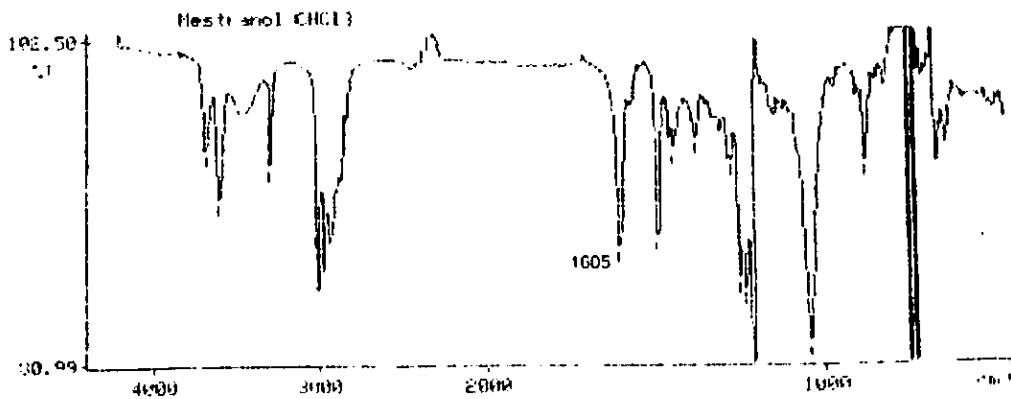
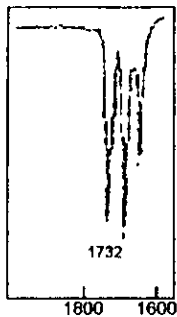


Figura No. 8 Espectro del compuesto II en CHCl_3

COMPUESTO I
1732 cm^{-1}



COMPUESTO II
1605 cm^{-1}

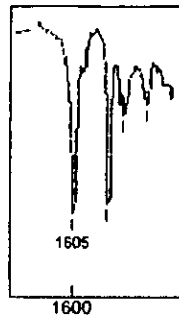


Figura No. 9 Banda elegida para cada uno de los compuestos

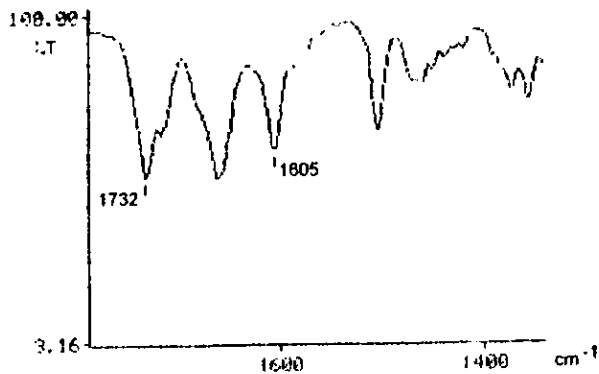


Figura No. 10 Espectro amplificado de la mezcla de los compuestos I y II en CHCl_3 (bandas de interés).

ACETATO DE CLORMADINONA/MESTRANOL CHCl₃

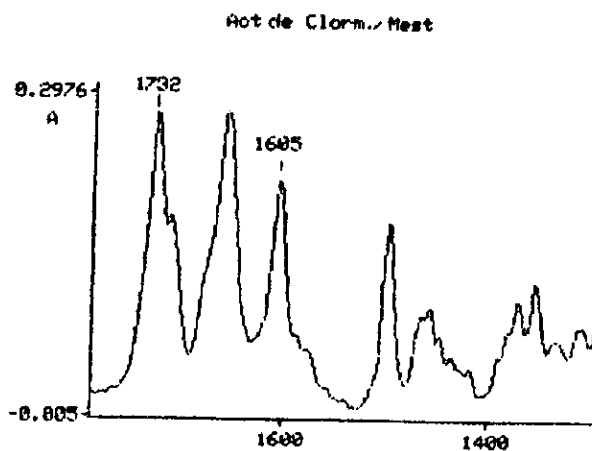


Figura No.11 Espectro en absorbancia con las bandas utilizadas para realizar la cuantificación de los compuestos I y II.

A. ACETATO DE CLORMADINONA.

a) Linealidad del sistema.

Concentración mg/mL	Abs. de la muestra Y1	Abs. de la muestra Y2
0.5	0.0065	0.0065
1	0.0131	0.0131
2	0.0273	0.02725
3	0.039	0.0397
4	0.0521	0.0521

Tabla No. 1 Resultados obtenidos experimentalmente en la linealidad del sistema.

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	1.4911	$\leq 1.5\%$
r	0.99956	≥ 0.99
r ²	0.99911	≥ 0.98

Tabla No.2 Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la linealidad

b) Precisión del sistema.

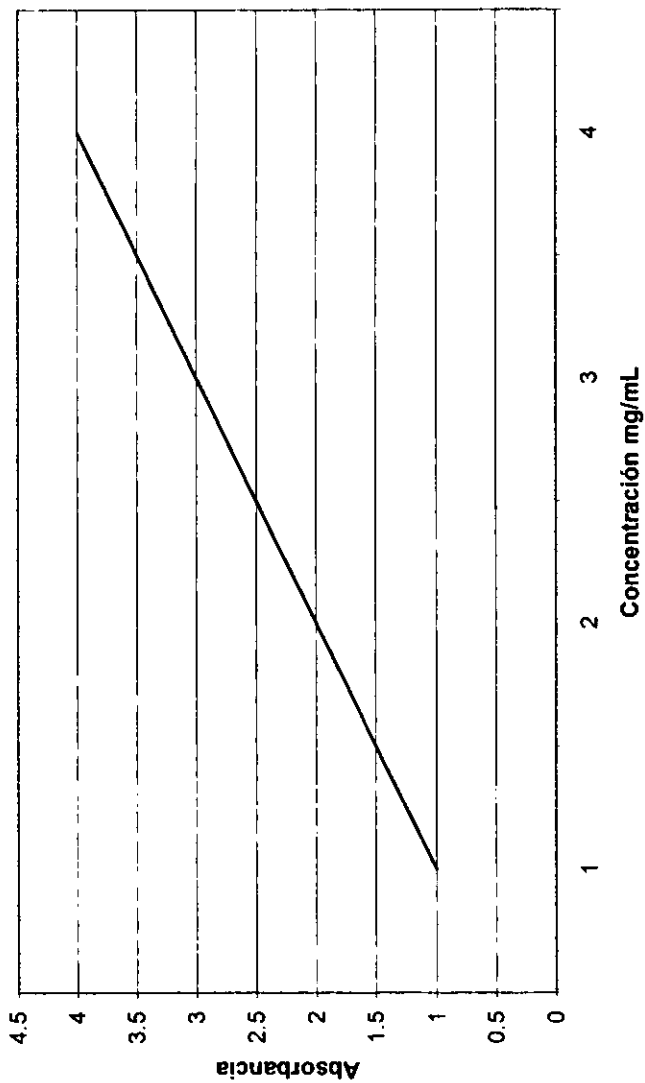
Concentración en mg/mL	Abs. de la muestra
2	0.0235
2	0.0235
2	0.0236
2	0.0235
2	0.0235
2	0.0235

Tabla No. 3 Resultados obtenidos al evaluar la precisión del sistema

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	0.17%	$\leq 1.5\%$

Tabla No. 4 Resultado del parámetro estadístico evaluado en la precisión del sistema

LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA EL COMPUESTO I



Gráfica No. 1

c) Linealidad del Método

Cantidad adicionada mg/mL	Cantidad recuperada mg/mL		
	Y1	Y2	Y3
1	0.994	1.0016	0.9864
2	2.0219	2.0372	1.9763
3	3.0042	3.0118	2.9661

Tabla No. 5 Resultados obtenidos en la determinación de la linealidad del método

Parámetro	Resultado	Criterio
m	1.00001	~1
b	-8.8888X10-5	~0
r ²	0.99934	≥0.98
%R	99.92592	97-103
CV	1.4885	≤ 3%

Tabla No. 6 Resultados de los parámetros evaluados en la determinación de linealidad del método

Estimación y prueba de hipótesis para la pendiente (m)

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$t_{\text{calc}} = 1.71806 \times 10^{-3}$$

$$t_{0.975} = 2.3060$$

Se acepta H_0

Intervalo de confianza: 0.9776 a 1.0223

Estimación y prueba de hipótesis para la ordenada al origen (b)

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

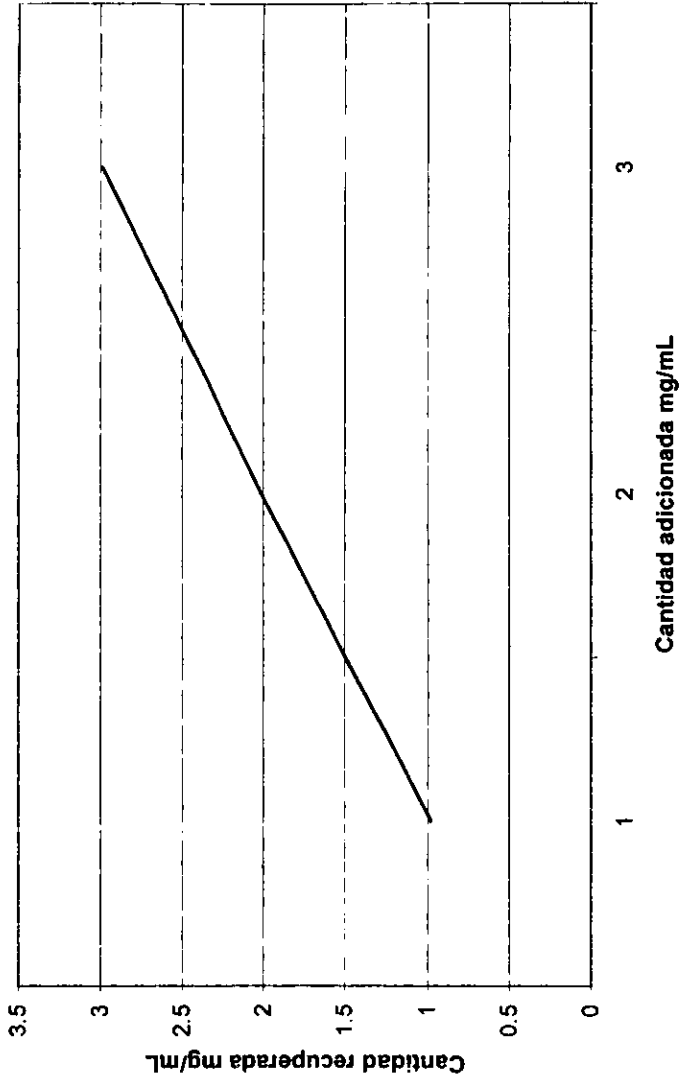
$$t_{\text{calc}} = -4.24044 \times 10^{-3}$$

$$t_{0.975} = 2.3060$$

Se acepta H_0 .

Intervalo de confianza -0.04842 a 0.04824

LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA EL COMPUESTO I



Gráfica No. 2

d) Exactitud y repetibilidad al 100%

Cantidad adicionada mg/mL	Cantidad recuperada mg/mL	% R
2	1.9991	99.955
2	2.0067	100.335
2	1.9991	99.955
2	2.0067	100.335
2	1.9991	99.955
2	2.0067	99.955

Tabla No. 7 Resultados obtenidos en la exactitud y repetibilidad al 100%

Parámetro	Resultado	Criterio
%R	100.00816	97-100%
CV	0.20%	≤ 3%

Tabla No. 8 Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la exactitud y repetibilidad al 100%

Prueba de hipótesis para μ con σ desconocido

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

$$t_{\text{calc}} = 1.0187$$

$$t_{0.975} = 2.5706$$

Ho se acepta

Intervalo de confianza 99.3541 a 100.8091

Prueba de hipótesis para la Repetibilidad

$$H_0: \delta \leq 2 \%$$

$$H_a: \delta > 2 \%$$

$$X^2_{\text{calc}} = 0.0481$$

$$X^2_{0.975} = 12.832$$

Ho se acepta

Intervalo de confianza 0.1224 a 0.4812

e) Precisión (Reproducibilidad)

DÍA	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	99.95	99.95
	100.33	100.33
	100.33	99.95
	100.71	100.33
2	100.33	100.33
	99.95	99.95

Tabla No. 9 Resultados de % R obtenidos en la determinación de precisión (reproducibilidad)

Prámetro	Resultado	Criterio
CV	0.247	≤ 3%

Tabla No. 10 Resultado del parámetro estadístico determinado para evaluar la precisión (reproducibilidad)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc.	F 0.05
ANALISTA	1	0.04817	0.04817	2.0012	38.51
DÍA	2	0.4814	0.02407	0.3333	6.06
ERROR	8	0.5776	0.0722	-	-

Tabla No. 11 Análisis de varianza para evaluar la precisión (reproducibilidad)

$F_a < F_{0.05}$	El método analítico es reproducible por los analistas
$F_d < F_{0.05}$	El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista

Tabla No. 12 Interpretación de los resultados de precisión (reproducibilidad)

f) Estabilidad de la muestra analítica.

Muestra	Inicial	TA/24h	TA/48h	4°C/24h
1	99.95	109.85	115.94	106.81
2	100.71	112.14	119.75	109.47
3	99.95	110.23	118.61	108.33

Tabla No. 13 %Recuperado en muestras analíticas almacenadas a distintas temperaturas e intervalos

Condición de almacenamiento	Intervalo de confianza	Resultado
TA/24h	8.7795-12.2938	Inestable
TA/48h	15.1947-20.5986	Inestable
4°C/24h	6.1027-9.8906	Inestable

Tabla No. 14 Resultados finales obtenidos en la evaluación de la estabilidad de la muestra

Condición de almacenamiento	Factor I (%)	Criterio (%)	Resultado
TA/24h	110.5	97-103	Inestable
TA/48h	117.85	97-103	Inestable
4°C/24h	107.97	97-103	Inestable

Tabla No. 15 Factor I promedio para cada condición

g) Límite de detección y Límite de cuantificación

Parámetro	Resultado
Límite de detección	0.01316mg/mL
Límite de cuantificación	0.04387mg/mL

Tabla No. 16 Resultados obtenidos en la determinación de los límites de detección y cuantificación

B. MESTRANOL

a) Linealidad del sistema.

Concentración en mg/mL	Abs. de la muestra 1	Abs. de la muestra 2
0.5	0.0028	0.0028
1	0.0055	0.0055
2	0.011	0.011
3	0.0165	0.0163
4	0.0219	0.022

Tabla No. 17 Resultados obtenidos experimentalmente en la linealidad del sistema

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	0.9351 %	$\leq 1.5\%$
R	0.99996	≥ 0.99
r ²	0.99993	≥ 0.98

Tabla No. 18 Resultados de los parámetros evaluados en la determinación de linealidad del método

b) Precisión del sistema.

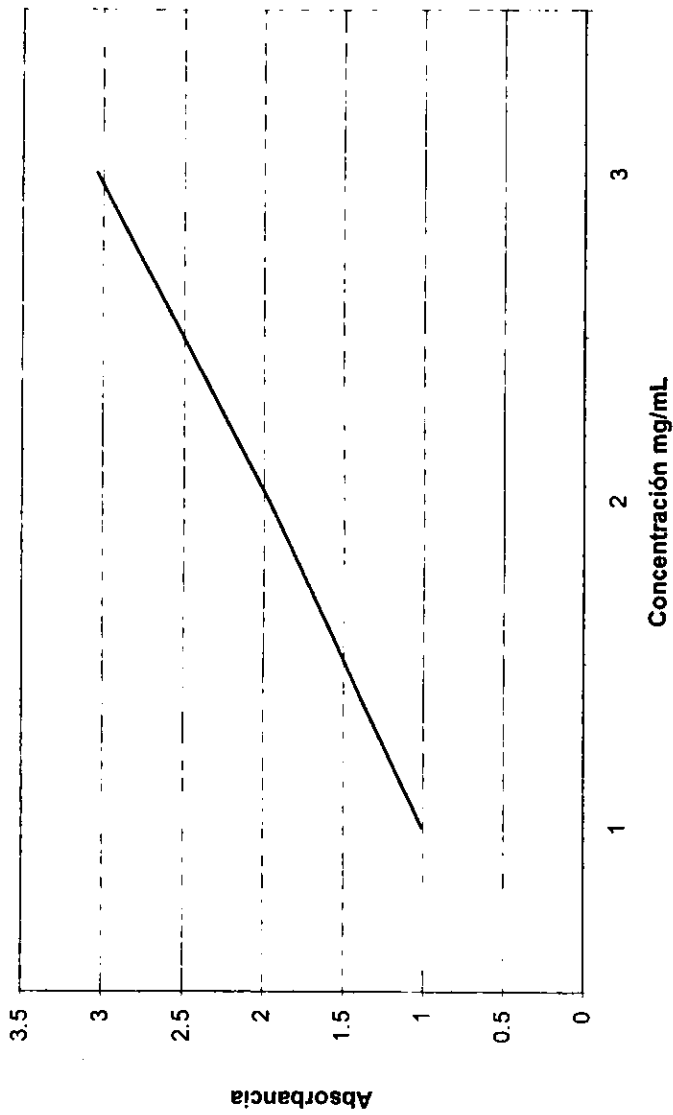
Concentración mg/mL	Abs. de la muestra
2	0.0081
2	0.0081
2	0.0082
2	0.0081
2	0.0081
2	0.0081
2	0.008

Tabla No. 19 Resultados obtenidos para evaluar la precisión del sistema

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	0.7808	$\leq 1.5\%$

Tabla No. 20 Resultado del parámetro estadístico, evaluado en la precisión del sistema

LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA EL COMPUESTO II



Gráfica No. 3

c) Linealidad del método.

Cantidad adicionada mg/mL	Cantidad recuperada mg/mL		
	Y1	Y2	Y3
1	1.0019	1.0198	1.0198
2	1.9126	2.0019	2.0019
3	2.9841	3.0734	3.0734

Tabla No.21 Resultados obtenidos en la determinación de la linealidad del método

Parámetro	Resultado	Criterio
m	1.0149	~1
b	-0.01993	~0
r ²	0.99722	≥ 98
%R	100.48146	97-103 %
CV	2.1448 %	≤ 3 %

Tabla No. 22 Resultados de los parámetros evaluados en la determinación de linealidad del método

Estimación y prueba de hipótesis para la pendiente (m)

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$t_{\text{cal}} = 0.73514 \quad t_{0.975} = 2.3060$$

Se acepta H_0

Intervalo de confianza 0.9681 a 1.0616

Estimación y prueba de hipótesis para la ordenada al origen (b)

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

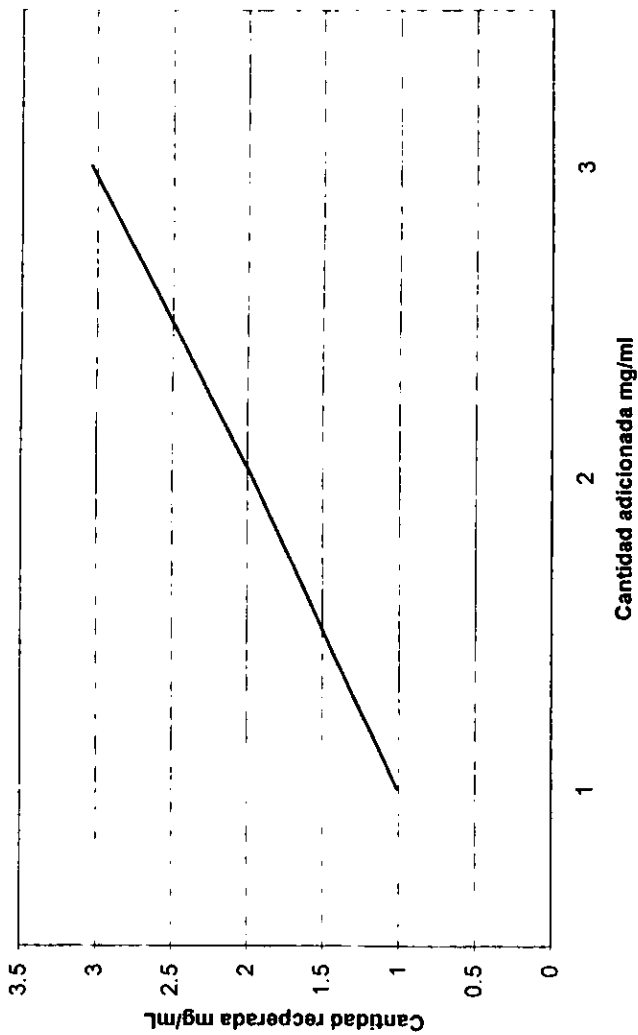
$$t_{\text{cal}} = -0.51622$$

$$t_{0.975} = -2.3060$$

Se acepta H_0

Intervalo de confianza -0.1289 a 0.0810

LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA EL COMPUESTO II



Gráfica No. 4

d) Exactitud y Repetibilidad al 100%.

Cantidad adicionada mg/mL	Cantidad recuperada mg/mL	% R
2	2.0019	100.095
2	2.0019	100.095
2	2.0734	103.67
2	1.9841	99.205
2	1.9841	99.205
2	2.0019	100.095

Tabla No.23 Resultados obtenidos en la exactitud y repetibilidad al 100%

Parámetro	Resultado	Criterio
% R	100.3941	97-103%
CV	1.6564	≤ 3 %

Tabla No. 24 Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de exactitud y repetibilidad al 100%

Prueba de hipótesis para μ con δ desconocido

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

$$t_{\text{calc}} = 0.5805$$

$$t_{0.975} = 2.5718$$

Se acepta H_0

Intervalo de confianza 98.2301 a 102.4681

Prueba de hipótesis para la repetibilidad

$$H_0: \delta \leq 2\%$$

$$H_a: \delta > 2\%$$

$$X^2_{\text{calc}} = 3.4565$$

$$X^2_{0.975} = 12.832$$

Se acepta H_0

Intervalo de confianza 1.0380 a 4.0789

e) Precisión (reproducibilidad).

Día	Analista 1	Analista 2
1	100.09	101.88
	100.09	100.99
	101.88	101.88
	100.99	100.99
2	100.09	100.09
	101.88	100.09

Tabla No.25 Resultados de los %R obtenidos en la determinación de precisión (reproducibilidad)

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	0.7986 %	≤ 3%

Tabla No. 26 Resultado del parámetro estadístico determinado para evaluar la precisión (reproducibilidad)

Fuente de variación	Grados de libertad	suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F 0.05
Analista	1	0.0675	0.0675	0.05944	38.51
Día	2	2.27107	1.1355	1.8901	6.06
Error	8	4.8062	0.6007	-	-

Tabla No. 27 Análisis de varianza para evaluar la precisión (reproducibilidad)

$F_a < F_{0.05}$	El método analítico es reproducible por los analistas
$F_d < F_{0.05}$	El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista

Tabla No. 28 Interpretación de los resultados de precisión (reproducibilidad)

f) Estabilidad de la muestra analítica.

Muestra	Inicial	TA/24h	TA/48h	4°C/24h
1	101.88	104.56	126.88	109.02
2	100.09	117.95	131.34	108.13
3	100.09	109.02	122.42	105.45

Tabla No.29 %Recuperado en muestras analíticas almacenadas a distintas temperaturas e intervalos

Condición de almacenamiento	Intervalo de confianza	Resultado
TA/24h	6.5726 - 13.0742	inestable
TA/48h	27.0353 - 31.3515	inestable
4°C/24h	5.8444 - 7.849	inestable

Tabla No.30 Resultados finales, obtenidos en la evaluación de la estabilidad de la muestra

Condición de almacenamiento	Factor I (%)	Criterio (%)	Resultado
TA/24h	109.79	97-103	inestable
TA/48h	125.99	97-103	inestable
4°C/24h	106.79	97-103	inestable

Tabla No.31 Factor I promedio para cada condición

g) Límite de detección y Límite de cuantificación.

Parámetro	Resultado
Límite de detección	0.05458 mg/mL
Límite de cuantificación	0.181964

Tabla No.32 Resultados obtenidos en la determinación de los límites de detección y cuantificación

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Al desarrollar el método analítico para la cuantificación de Acetato de Clormadinona (I) y Mestranol (II) en anticonceptivos orales y su posterior validación, fué necesario conocer los espectros en el infrarrojo de las sustancias puras y de la mezcla, para identificar bandas características en cada uno de los compuestos que siguieran la ley de Lambert-Beer y no se superpusieran entre sí. Las bandas elegidas fueron las localizadas en 1732 cm^{-1} para el Acetato de Clormadinona y 1605 cm^{-1} para el Mestranol. Se comprobó que los exipientes no absorbieran en esta posición.

Tuvieron que elegirse las condiciones y el disolvente más apropiados para la extracción de ambos principios activos de la formulación.

Inicialmente se evaluó la linealidad del sistema, obteniéndose un coeficiente de variación (CV) de 1.49% para I y de 0.93 % para II, ambos fueron menores al 1.5%, el coeficiente de correlación (r) fue de 0.99 para I y de 0.99 para II y el coeficiente de determinación (r^2) de 0.999 para I y de 0.999 para II, resultando ambos, mayores a 0.98 y 0.99 respectivamente, lo que demostró la linealidad del sistema, puesto que, la respuesta es proporcional a la concentración en el rango empleado de 0.5 a 4 mg/mL.

Con lo que respecta a la precisión del sistema se obtuvieron coeficientes de variación de 0.17% y de 0.78% para los compuestos I y II respectivamente, como ambos fueron menores al 1.5% se demostró la precisión del sistema para cada compuesto.

Dado que el sistema fue lineal y preciso, se prosiguió a validar el método. Para esto se utilizaron cantidades adicionadas. La solución empleada para las determinaciones, fue la resultante de la extracción de los principios activos de las tabletas. De esta manera, se consideraron las cantidades iniciales presentes en la muestra.

En la linealidad del método se obtuvieron para los compuestos I y II pendientes (m) de 1.00 y de 1.01 (ambos valores cercanos a 1), ordenadas al origen (b) de -8.88×10^{-5} y de -0.01 (tienden al cero), porcentajes de recobro (R) de 99.92% y de 100.48% (se encuentran en el intervalo de 97-103%), coeficientes de correlación (r) de 0.99 y de 0.99 (mayores al 98%), así como coeficientes de variación (CV) de 1.48 % y de 2.14 % (menores al 3%) respectivamente, lo cual demostró que el método es lineal.

Los requisitos mínimos para validación del método, establecido en la guía de validación, no exigen probar estadísticamente, mediante contraste de hipótesis, parámetros como la pendiente (m) ordenada al origen (b), pero fueron evaluadas; encontrándose que, para ambos compuestos, $m \sim 1$ y $b \sim 0$. De esta manera, fué aceptada la hipótesis nula que nos indica que la pendiente es igual a 1 y la ordenada al origen igual a cero.

Para evaluar exactitud y repetibilidad al 100% se obtuvieron coeficientes de variación de 0.196% y de 1.656% (menores al 3%); por ciento de recobro de 100.08% y de 100.39% (dentro del intervalo de 97-103%). La prueba estadística adicional para el promedio de por ciento recuperado, mostró que éste, no es significativamente diferente al 100%, manifestando así, que el método es exacto y que existe concordancia entre los valores obtenidos y la cantidad adicionada de cada uno de los compuestos. Al ser rechazada la hipótesis alterna se dedujo que el método es repetible.

En la evaluación de la reproducibilidad se obtuvieron coeficientes de variación de 0.24% y de 0.79% (menores al 3%). En la prueba estadística adicional (F de Fisher) para el analista y para el día, se obtuvo $F_a = 2.02$ (que fue menor al $F_{0.05} = 38.51$) y $F_d = 0.33$ (que fue menor al $F_{0.05} = 6.06$) para el compuesto I. Para el compuesto II se obtuvieron $F_a = 0.0594$ (que fue menor al $F_{0.05} = 38.51$) y $F_d = 1.89$ (que fue menor al $F_{0.05} = 6.06$). Por lo tanto, el método analítico para ambos compuestos fue reproducible por dos analistas en distintos días y en diferentes días por un mismo analista, resultado que garantiza la confiabilidad, aún cuando no puedan controlarse variables como materiales, equipo, reactivos, laboratorios, analistas o día de la determinación.

Al evaluar la estabilidad de las muestras analíticas, se encontró, que los datos de por ciento recuperado obtenidos después de 24 y 48 horas a temperatura ambiente y después de 24 horas en refrigeración, son altos, lo que indicó concentración de la muestra por evaporación. En el cálculo de Intervalo de confianza no se encontró incluido el valor de cero (significa que las muestras analíticas son inestables debido a la volatilidad del disolvente utilizado).

Los valores promedio, obtenidos para el factor I, estuvieron fuera del límite establecido, así se confirmó la inestabilidad de las muestras bajo las condiciones de operación en las que se trabajaron. Por ésto, observamos que es más conveniente analizar las muestras el mismo día de su preparación.

Aunque para control de calidad, la guía de validación no contempla la evaluación de límites de detección y cuantificación, fueron evaluados con el propósito de resaltar la capacidad del instrumento para detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de principios activos. Los valores obtenidos para el límite de detección fueron de 0.0131 mg/mL y de 0.0545 mg/mL en los compuestos I y II, respectivamente. El límite de cuantificación fue de 0.0438 mg/mL y de 0.1819 mg/mL, respectivamente.

X. CONCLUSIONES

1. Las bandas de absorción seleccionadas desde el espectro en el infrarrojo para la cuantificación de cada fármaco, fueron a 1732 cm^{-1} para Acetato de Clormadinona y 1605 cm^{-1} para Mestranol.

2. Se seleccionaron las condiciones de extracción de los compuestos I y II, eligiéndose como disolvente el cloroformo,

3. El instrumento permite fijar la escala y el intervalo del espectro útil, así como obtener directamente las lecturas de absorbancia lo que facilita la medición de las bandas para cada concentración.

4. Se demostró que el método para cuantificación de los compuestos I y II en anticonceptivos orales, fue lineal, exacto, preciso (repetible, reproducible) y específico para ambos casos, lo que permite emplearlo de manera confiable como método de rutina en el control de calidad, para cuantificar dichos compuestos.

5. Esta técnica, es más rápida que la descrita en la Farmacopea de México y permite cuantificar ambos compuestos sin separación previa y requiere de menos reactivos y disolventes.

6. Esta técnica permite observar a los compuestos e identificar si existen contaminantes y/o compuestos de degradación.

XI. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

1. Cuidar el llenado y lavado de las celdas ya que son variables fundamentales para las determinaciones cuantitativas en IR. La presencia de humedad, residuos o burbujas, ocasiona errores considerables en las lecturas.
2. Probar este instrumento en determinaciones cuantitativas de otros compuestos solos o combinados para aprovechar las ventajas que ofrece esta técnica (rapidez, poca manipulación, utilización de menos reactivos y disolventes, etc.).
3. Proponer a la comisión de Farmacopea el introducir esta técnica con fines cuantitativos.
4. Considerar el realizar la cuantificación empleando métodos de Reflectancia, ya que esto evitaría el proceso de extracción y permitiría el estudio directo del segundo medicamento.

XII ANEXO

A. GLOSARIO

b = ordenada al origen

r = coeficiente de correlación

r² = coeficiente de determinación

CV = coeficiente de variación

IC = intervalo de confianza

m = pendiente

n = número de determinaciones

t = número de diluciones o número de cantidades adicionadas

y = media aritmética

N = número total de determinaciones

s² = varianza

DE = desviación estándar

x = concentración de la solución o cantidad adicionada

y = propiedad medida o cantidad recuperada

R = por ciento de recobro

\bar{R} = promedio aritmético del por ciento recuperado

a = analista

d = día

gl = grados de libertad

MC = media de cuadrados

F = valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada de 0.975

SC = suma de cuadrados

Σ = sumatoria

t = valor de distribución "t" de Student con una probabilidad acumulada de 0.975

t* = valor de la distribución "t" de Dunnet con una probabilidad acumulada de 0.975

Sp² = varianza ponderada

F = factor para cálculos en la linealidad del sistema

I = factor para cálculos en la estabilidad de la muestra

c = número de comparaciones en la prueba " t" de Dunnet
gl = grados de libertad
gla= grados de libertad del analista
gld = grados de libertad del día

B. FORMULARIO ESTADÍSTICO

a) Límite de detección y cuantificación

1. Desviación estándar

$$s = [\Sigma(x-x)^2 /n-1]^{1/2}$$

Donde:

s = desviación estándar

x = cada una de las lecturas individuales

\bar{x} = promedio de las lecturas

n = número de las lecturas

Con la desviación estándar se calcula el límite de detección y cuantificación.

$$LD = 3 sc/\bar{x}$$

$$LQ = 10 sc/\bar{x}$$

Donde:

c = concentración

LD = límite de detección

LQ = límite de cuantificación

b) Linealidad del sistema

Los resultados se tabulan de acuerdo al siguiente formato:

Concentración (X)	Propiedad medida (Y)
X1	Y11, Y12, ..., Y1n
X2	Y21, Y22, ..., Y2n
...	...
...	...
...	...
Xt	Yt1, Yt2, ..., Ytn

t = número de diluciones

n = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

1. Cálculos preliminares.

$$\Sigma X = n (X_1 + X_2 + \dots + X_t)$$

$$\Sigma Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}$$

$$\Sigma X^2 = n (X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_t^2)$$

$$\Sigma Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2$$

$$\Sigma XY = X_1(Y_{11} + Y_{12} + Y_{1n}) + X_2(Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n}) + \dots + X_t(Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn})$$

2. Coefficiente de correlación y de determinación.

$$r = \left\{ \frac{[nt(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)]^2}{[nt(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2][nt(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]} \right\}^{1/2}$$

$$r^2 = (r)^2$$

3. Factor F.

F = Propiedad medida (Y) / conc. de la dilución (X)

$$F_{11} = Y_{11} / X_1, \quad F_{12} = Y_{12} / X_1, \quad F_{1n} = Y_{1n} / X_1 \dots$$

$$F_{11} = Y_{11} / X_{11}, \quad F_{12} = Y_{12} / X_{11}, \quad F_{1n} = Y_{1n} / X_{11}$$

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{11} + F_{12} + F_{1n}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2$$

$$F = \Sigma F / N$$

N = número de puntos de la linealidad del sistema

4. Coeficiente de variación.

$$DE = [N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE / F) 100$$

5. Pendiente.

$$m = nt (\Sigma XY) - (\Sigma X Y) (\Sigma Y) / nt (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2$$

6. Ordenada al origen.

$$b = \Sigma Y - m (\Sigma X) / n$$

c) Precisión del sistema

1. Cálculos preliminares.

$$\Sigma Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n$$

$$\Sigma Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots + Y_n^2$$

$$Y = \Sigma Y / N$$

$$DE = [N (\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

2. Coeficiente de variación.

$$CV = (DE / Y) 100$$

d) Linealidad del método

Se determinan la m, b, r² %R y CV. Para proceder a realizar los cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

1. Cálculos preliminares.

$$\Sigma X = X_{11} + X_{12} + \dots + X_{1n} + X_{21} + X_{22} + \dots + X_{2n} + \dots + X_{t1} + X_{t2} + \dots + X_{tn}$$

$$\Sigma Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + \dots + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}$$

$$\Sigma X^2 = X_{11}^2 + X_{12}^2 + \dots + X_{1n}^2 + X_{21}^2 + X_{22}^2 + \dots + X_{2n}^2 + \dots + X_{t1}^2 + X_{t2}^2 + \dots + X_{tn}^2$$

$$\Sigma Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2$$

$$\Sigma XY = X_{11}Y_{11} + X_{12}Y_{12} + \dots + X_{1n}Y_{1n} + X_{21}Y_{21} + X_{22}Y_{22} + \dots + X_{2n}Y_{2n} + X_{t1}Y_{t1} + X_{t2}Y_{t2} + \dots + X_{tn}Y_{tn}$$

2. Pendiente ordenada al origen y coeficiente de determinación:

$$m = nt (\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y) / nt(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2$$

$$b = \Sigma Y - m(\Sigma X) / nt$$

$$r^2 = [nt (\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)]^2 / [nt(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] [nt(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]$$

3. Porcentaje recuperado:

$$R = (Y/X) 100$$

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = (\Sigma R) / N$$

4. Coeficiente de variación.

$$DE = [N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2 / N(N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE / R) 100$$

5. Estimación y prueba de hipótesis para la pendiente:

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

5.1 Estadígrafo de contraste:

$$t_{cal} = (m - m_0) S_x (n-1)^{1/2} / S_{Y/X}$$

5.2 Error típico:

$$\hat{S}_{XY} = [(\Sigma Y^2) - b(\Sigma Y) - m(\Sigma XY) / n]^{1/2}$$

5.3 Error típico modificado:

$$S_{Y/X} = [n/n-2]^{1/2} S_{Y/X}$$

6. Estimación y prueba de hipótesis para la ordenada:

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

6.1 Estadígrafo de contraste:

$$t_{cal} = b_{cal} - b_0 / S_{Y/X} [\Sigma X^2 / n \Sigma (X_1 - X)^2]^{1/2}$$

Si $t - \alpha / 2 < t_{cal} < t \alpha / 2$ se acepta H_0

6.2 Intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada al origen:

$$m \pm \alpha / 2 [S_{Y/X} / S_x (n-1)^{1/2}]$$

$$b \pm t_{\alpha / 2} S_{Y/X} [\Sigma X^2 / n \Sigma (X_1 - X)^2]^{1/2}$$

$$gl = n-1$$

$$\alpha = 0.05$$

e) Precisión (repetibilidad)

Se determina con el %R y el CV

1. Porcentaje recuperado.

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \Sigma R / N$$

2. Coefficiente de variación:

$$DE = [N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2 / N(N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE / \bar{R})100$$

f) Precisión (reproducibilidad)

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen dos días, dos analistas y tres determinaciones.

Día	Analista 1	Analista 2
1	Y111	Y211
	Y112	Y212
	Y113	Y213
2	Y121	Y221
	Y122	Y222
	Y123	Y223

1. Cálculos preliminares.

$$\Sigma Y = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$\Sigma Y^2 = Y_{111}^2 + Y_{112}^2 + Y_{113}^2 + Y_{121}^2 + Y_{122}^2 + Y_{123}^2 + Y_{211}^2 + Y_{212}^2 + Y_{213}^2 + Y_{221}^2 + Y_{222}^2 + Y_{223}^2$$

$$Y = \Sigma Y / N$$

N= número total de determinaciones

2. Coefficiente de variación.

$$DE = [N (\Sigma Y^2) - (\Sigma Y \dots)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE / Y) 100$$

Una prueba estadística adicional para la prueba de precisión, específicamente de la reproducibilidad es la siguiente:

Suma de las combinaciones analistas-día (Y_{ij}):

$$Y_{11} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{21} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Suma para cada analista (Y_{j..}):

$$Y_{1..} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{2..} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Suma total (Y_{...}):

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

Suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\Sigma \Sigma Y^2_i = (Y_{11..})^2 + (Y_{12..})^2 + (Y_{21..})^2 + (Y_{22..})^2$$

Sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$(\Sigma Y_{1..})^2 = (Y_{1..})^2 + (Y_{2..})^2$$

Suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\Sigma\Sigma Y_{ijk}^2 = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

Suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista:

$$SCa = [\Sigma Y_{i..}^2 / dr] - [\Sigma Y_{...}^2 / adr]$$

Suma de cuadrados del día y el analista (SCd):

$$SCd = \Sigma\Sigma Y_{ij.}^2 / r - \Sigma Y_{i..}^2 / dr$$

Suma de cuadrados del error (SCe) :

$$SCe = \Sigma\Sigma\Sigma Y_{ijk}^2 - \Sigma\Sigma Y_{ij.}^2 / r$$

Con los datos anteriores construir la tabla de análisis de varianza (ANADEVA):

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcalc.	F0.05*
Analista (a)	g/a = a-1	SCa	MCa=SCa/g/a	Fa=MCa/MCd	Fg/a/g/d
Día (d)	g/d =(d-1)a	SCd	MCd=SCd/g/d	Fd=MCd/MCe	Fg/d/g/e
Error (e)	g/e = (r-1)ad	SCe	Mce=SCe/g/e	-	-

Interpretación de resultados:

Si $F_a < F_{g/a/g/d}$, el método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a \geq F_{g/a/g/d}$, el método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_d < F_{g/d/g/e}$, el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_d \geq F_{gld/gle}$, el método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

g) Exactitud al 100%

Se determina con el %R y el CV

1. Porcentaje recuperado.

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \Sigma R / N$$

2. Coefficiente de variación.

$$DE = [N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE/\bar{R}) 100$$

3. Prueba de hipótesis para μ con σ desconocida:

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

3.1 Estadígrafo de contraste:

$$t_{cal} = R - 100 / [DE/(N)^{1/2}]$$

$$t_{tab} (1 - \alpha/2)$$

$$\alpha = 0.05$$

*estos valores se obtienen de tablas, para un $\alpha = 0.05$

3.2 Intervalo de confianza:

$$IC = R \pm (gl \cdot n^{-1}, 0.975) DE/N^{1/2}$$

4. Prueba de hipótesis para repetibilidad del método:

Ho: $d \leq 2$

Ha: $d > 2$

4.1 Estadígrafo de contraste:

$$X_i^2 \text{ calc} = (N-1) (DE)^2_{\text{experimental}} / \delta^2_{\text{teórica}}$$

$\alpha = 0.05$

$gl = n-1$

Regla de decisión $X_i^2 < X_i^2_{\text{tablas}}$

4.2 Intervalo de confianza

$$[(n-1) DE^2 / X_i^2 \cdot 1 - \alpha / 2 (0.975)]^{1/2} < \sigma < [(n-1) DE^2 / X_i^2 \cdot 1 - \alpha / 2 (0.025)]$$

h) Estabilidad de la muestra analítica.

Se evalúa mediante los intervalos de confianza para cada condición/tiempo.

Inicial	Condición/Tiempo			m
	1	2		
Y1	Y4	Y7		Yn-2
Y2	Y5	Y8		Yn-1
Y3	Y6	Y9		Yn

1. Cálculos preliminares:

Media Y₀ Y₁ Y₂ Y_M

Varianza S₀² S₁² S₂² S_{m2}

$$S_{p1}^2 = 2S_0^2 + 2S_1^2 / 2(c+1)$$

$$S_{p2}^2 = 2S_{02} + 2S_2^2 / 2(c+1)$$

$$S_{pm}^2 = 2S_0^2 + 2S_m^2 / 2(c+1)$$

2. Intervalo de confianza para cada condición/tiempo:

$$IC = (Y_i - Y_0) \pm t^* [S_{pi}^2 (2/3)]^{1/2}$$

3. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

Para cada condición /tiempo/muestra, calcular el factor I:

$$I = \{ [(\text{análisis muestra} / \text{condición} / \text{tiempo})_i] / [(\text{análisis inicial})_i] \} 100$$

$$I_1 = (Y_4 / Y_1) 100$$

$$I_2 = (Y_5 / Y_2) 100$$

$$I_3 = (Y_6 / Y_3) 100$$

$$I_4 = (Y_7 / Y_1) 100$$

$$I_5 = (Y_8 / Y_2) 100$$

$$I_6 = (Y_9 / Y_3) 100$$

$$I_7 = (Y_{n-2} / Y_1) 100$$

$$I_8 = (Y_{n-1} / Y_2) 100$$

$$I_9 = (Y_n / Y_3) 100$$

4. Media del factor I para cada condición tiempo:

$$I = \Sigma I (\text{condición} / \text{tiempo}) / N$$

$$l_1 = (l_1 + l_2 + l_3) / 3$$

$$l_2 = (l_4 + l_5 + l_6) / 3$$

$$l_3 = (l_7 + l_8 + l_9) / 3$$

N = no. de muestras para cada condición tiempo

2^* =valor de la t de dunnet con c comparaciones y $2(c+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Cuadro Básico de Medicamentos, Sistema Nacional de Salud, p. 399, (1989).
2. Remington, A., "Farmacia", vol. I y II, 17a ed., Ed. Panamericana, Argentina, p.854,846-848,851-859, (1990).
3. Lual, "Componentes para un programa de validación de métodos analíticos", Pharma News, 4(5):39,40, (1993).
4. Castañeda, P., Giral, C., "Validación de métodos analíticos de control de insumos para la salud", S.S.A., p. 11-68, (1991).
5. Litter, M., J., "Farmacología experimental clínica", Ed. El Ateneo, México, p.1237-1273, (1980).
6. Katzung, B. G., "Farmacología básica clínica", 2a ed., Ed. El manual moderno, México, p.481-505 (1986)
7. Duran, M., "Proyecto de validación de dos métodos analíticos para la cuantificación de Noretindrona y Etinil estadiol en producto terminado (CLAR y HPLC)", Tesis de licenciatura, FES-ZARAGOZA; UNAM, p.4, (1992).
8. Diccionario de especialidades farmacéuticas", 39a ed., Ediciones PLM, p.1297, (1993).
9. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a ed., Secretaria de Salud, p. 761-762, 1091-1092, (1985).
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6a ed., p. 1006-1007, 1243-1244, (1994).

11. The Merck Index, 8a. ed., Ed. Merck Co. USA, p. 194, 196, 325, 598, 605, 606, 638, 644, 930, 980, 993, 1011, 2137, (1968).
12. Florey, K., "Analytical Profiles of Drugs Substances", vol. II, Ed. Academic Press Inc., p. 375-406, (1982).
13. Ingle, Jr. D., et al, "Spectrochemical Analysis", Ed. Hall, New Jersey, p. 404-437, (1988) .
14. Fessenden, J. R., Fessenden, S.J., "Química orgánica", Ed. Iberoamerica, México, p. 320-336, (1983) .
15. Willard, H.H., et al, "Métodos Instrumentales de Análisis", Ed. Cía Editorial Continental, México, p. 175-208 (1981)
16. Dyer, J. R., "Aplicaciones de Espectroscopía de Absorción en Compuestos orgánicos", Ed. Prentice/Hall Internacional, México, p. 22-29, (1973).
17. Page, J.E., "Applications of Infrared Spectroscopy, Chemistry and Industry", 58-63, (1957).
18. Nakanishi, K, "Infrared Absortion Spectroscopy", Ed. Holden-Day, San Francisco, p. 166, (1962).
19. Grifaldo, V.M., "Espectroscopía de varios derivados de 2 H-1, 4 - Benzodiazepin-1, 3-dinidro-z-ona de interés farmacológico de México", Tesis de Licenciatura ENEP ZARAGOZA, p. 9-11, (1986).
20. Lascano, P.L.P., "Instrumentación Analítica", Diplomado Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca México, p. 1-18, (1993).
21. Cano J., Zavala D., "Introducción a la espectroscopía de IR", Perkin Elmer de México, (1985) .

22. Skoog A.D., West D.M.; "Análisis Instrumental", 2a. ed., México, Ed. Nueva Editorial Interamericana, p. 158-163,221-223, 231, 232-237, 250-254, 257, 264-266, (1987).

23. British Pharmacopeia, Tomos I y II, United Kingdom, Her Majesty's Stationery Office 1988, p. 384,385,972, 585, (1988).

24. Hannah, R.W., Swinehart,"Experiments in Techniques of Infrared Spectroscopy", Ed. Perkin-Elmer, USA, (1975).

25. "Notas para el curso básico de Espectroscopía Infrarroja", México Perkin Elmer de México, (1995).

26. Conley, M., "Espectroscopía Infrarroja", Ed. Alhambra, Madrid, p. 20-35, (1979).

27. Cruz, M.T., "Análisis Cualitativo y Cuantitativo por Espectroscopía de Infrarrojo de los componentes de las lacas acrílicas usadas como recubrimientos", Tesis de licenciatura, ENEP-ZARAGOZA, p. 12-14, (1986).

28. Hirai, S., et al, "Sensitive Method for Determination of Etinyl Estradiol in presence of Norethindrone, J. Pharm. Sci, 69(7): 857-859, (1980).

29. Robinson, D.Z., "Quantitative Analysis with Infrared Spectrophotometers, Anal. Chem., 23 (2):273-277, (1951).

30. Robinson, D.Z., "Quantitative Analysis with Infrared Spectrophotometers", Anal. Chem., 24(14): 619-622, (1952).

31. Sundaresan, G.M., et al, "Simple High Performance Liquid Chromatographic Assay for Norethindrone-Mestranos in Combinación tablets", J.Pharm Sci, 70 (6):702-703, (1981).

32. Kwakye, J.K., "Use of NMR for Cuantitative Analysis of Pharmaceuticals", Talanta, 32 (11) :1068-1071, (1985).

33. Lual, "Modelos Estadísticos y Validación de Métodos Analíticos", (primera parte), Pharma News, 4 (7): 332-344, (1993).

34. Lual, "Modelos Estadísticos y Validación de Métodos Analíticos", (tercera parte), Pharma News, 4 (19): 16-19, (1993).

35. Lual, "Modelos estadísticos y Validación de Métodos Analíticos" (cuarta parte), Pharma News, 4 (11): 26-28, (1993).

36. Lual, "Modelos estadísticos y Validación de métodos Analíticos" (segunda parte), Pharma News, 4 (7): 24-25, (1993).