



12
29

Universidad Nacional Autónoma de México

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

***Desarrollo y Validación de un Método
Espectrofotométrico para Cuantificar
Dexametasona-21-Sodio-Fosfato en una
Solución Nasal y en una Solución Oftálmica***

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presentan:

**DOMINGUEZ ESPINOSA LUIS
SANCHEZ REYES JUAN MANUEL**

México, D. F.

1990.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
1. FUNDAMENTACION	1
1.1 Desarrollo y validación de un método analítico	1
1.2 Espectroscopía de absorción	6
1.3 Antecedentes respecto a los métodos de análisis	9
1.4 Relación estructura-actividad de los esteroides	11
1.5 Propiedades farmacológicas de la DSF	13
1.6 Dexametasona-21-sodio-fosfato.	15
1.7 Dexametasona base.	17
1.8 Sulfato de neomicina.	20
1.9 Clorhidrato de fenilefrina.	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. OBJETIVOS.	24
4. HIPOTESIS.	25
5. FORMULACIONES	26
6. MATERIAL	27
7. METODOLOGIA	29
7.1 Método desarrollado para la solución oftálmica.	30
7.2 Método desarrollado para la solución nasal	31

8. VALIDACION DEL METODO ANALITICO DESARROLLADO	
PARA LA SOLUCION OPTALMICA	33
8.1 Especificidad del método	33
8.2 Linealidad del sistema	33
8.3 Precisión, exactitud y linealidad del método.	34
8.4 Reproducibilidad	34
9. VALIDACION DEL METODO ANALITICO DESARROLLADO	
PARA LA SOLUCION NASAL	35
9.1 Especificidad del método	35
9.2 Linealidad del sistema	36
9.3 Precisión, exactitud y linealidad del método.	36
9.4 Reproducibilidad	36
10. RESULTADOS	38
10.1 Solución oftálmica.	38
10.2 Solución nasal	50
11. ANALISIS DE RESULTADOS	64
11.1 Solución oftálmica.	64
11.2 Solución nasal	66
12. CONCLUSIONES	69
12.1 Solución oftálmica.	69
12.2 Solución nasal	70

INTRODUCCION

Dentro de la industria farmacéutica, una de las etapas de mayor importancia en el desarrollo de nuevas formulaciones es la validación del proceso, así como las técnicas de análisis para su cuantificación con el objeto de garantizar la calidad del producto (37, 38 y 39)

El concepto de validación es sin duda el centro de los mayores cambios en las normas de prácticas adecuadas de manufactura (PAM'S)* y de laboratorio (PAL'S)*, e implica el poner a prueba un proceso o un método con el objeto de determinar sus parámetros óptimos de operación y su metodología de control, para así reproducir eficazmente lote tras lote, es decir, fabricar un producto farmacéutico acorde a las especificaciones de calidad establecidas.

Los fabricantes de medicamentos han desarrollado formulaciones y procesos que han validado por diferentes métodos y técnicas garantizando la elaboración de productos seguros, efectivos y de calidad. Después que un producto nuevo ha sido desarrollado, es necesario tener un método analítico adecuado para la cuantificación del(los) principio(s) activo(s), posteriormente es importante validarlo.

Existen tres razones por las cuales la industria farmacéutica está preocupada por que sus procesos, así como las técnicas analíticas para cuantificar el fármaco sean validados, éstas son:

- 1) Normas legales y reglamentaciones oficiales
- 2) La garantía de calidad
- 3) La reducción de costos

La dexametasona-21-sodio-fosfato es un corticosteroide antiinflamatorio y antialérgico utilizado en diversos tratamientos, por lo que es importante controlar la calidad de sus presentaciones farmacéuticas a través de técnicas analíticas sencillas, económicas y rápidas.

Las técnicas oficiales establecidas para cuantificar el principio activo dexametasona-21-sodio-fosfato (20, 21 25 y 26) presentan la desventaja de ser costosas y las hace inaccesibles a laboratorios farmacéuticos pequeños, ya que se requiere del equipo de cromatografía de gases y de líquidos.

Tomando éstas consideraciones, se desarrolló y validó un método espectrofotométrico para cuantificar dexametasona-21-sodio-fosfato en una solución nasal y en una solución oftálmica, el cual resultó ser específico, lineal, exacto, preciso y económico para ambas soluciones farmacéuticas.

En el presente trabajo se utilizan las siglas "DSF" cuando se hace referencia al principio activo dexametasona 21-sodio-fosfato.

(*) Siglas adoptadas por la comisión internacional de prácticas adecuadas de manufactura y de laboratorio en México (CIPAM y CIPAL).

1. FUNDAMENTACION

1.1 Desarrollo y validación de un método analítico,

1.1.1 Importancia. La aparición de nuevas y complejas formulaciones en los medicamentos, implica el desarrollo de métodos analíticos cuya precisión, exactitud y reproducibilidad permitan efectuar una valoración cualitativa y cuantitativa adecuada del o los principios activos presentes y que además, eliminen hasta donde sea posible las interferencias que se presenten debidas a otras sustancias contenidas en la misma forma farmacéutica.

El desarrollo de un método requiere de factores tan importantes como el del conocimiento profundo de las características físicas, químicas y fisicoquímicas de las sustancias sujetas al análisis, además la destreza necesaria para aprovechar al máximo los recursos que nos proporciona el análisis instrumental moderno.

El término validación se puede definir como la determinación del grado de valor de un método y se puede tomar como significativo al hacer válido un método o proceso en el sentido de producir el resultado deseado. La forma de validar un método analítico depende de la aplicación que se le va a dar (en control de calidad, estudios de estabilidad o análisis de proceso), de los requerimientos gubernamentales, y desde luego del criterio de la persona que

lo realiza. Considerando la variedad de ensayos, es lógico que los diferentes métodos analíticos requieran diferentes esquemas de validación, las categorías de métodos más comunes que requieren ser validados son diversas.

A continuación se propone una guía para validar métodos analíticos:

1.1.2 Linealidad del sistema. Es el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo:

$$Y = A + Bx$$

Donde: $A = 0$

$B = 1$

Quando se trabaja con diferentes concentraciones.

La curva de calibración analítica se determina por análisis de estándares, usualmente en concentraciones que varían entre el 60% y el 140% del valor esperado de la muestra. La curva resultante se debe presentar con los datos obtenidos y con el valor del coeficiente de correlación (r), cuanto más cercano a la unidad se encuentre el valor de " r ", más lineal será el método. También se busca que la linealidad presente un intercepto al origen de cero.

1.1.3 Rango analítico. Indica la concentración más alta y la más baja de la sustancia que se ajusta a la función matemática que relaciona la respuesta del detector con la concentración, o el rango de concentraciones en que se estudia esta respuesta.

1.1.4 Linealidad del método. Es la relación que se establece mediante una línea recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad adicionada).

Se lleva a cabo analizando muestras, cuando menos a tres diferentes concentraciones (del 60% al 140%), con respecto a lo estipulado en el método analítico, incluyendo el 100%, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración como mínimo. Indica el efecto que puede tener la presencia de las sustancias auxiliares en la formulación (excipientes o vehículos), cuando en alguna ocasión se modifica la cantidad de muestra empleada para el análisis, o cuando se ha detectado un error en la manufactura del producto. Los criterios para considerar un método lineal son: $A = 0$; $B = 0.99$; $r = 0.98$.

1.1.5 Precisión. Es la concordancia mutua entre los resultados obtenidos en una serie de ensayos. Se expresa como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

$$CV = 100 \times DE / \bar{X}$$

Donde: CV = Coeficiente de variación

DE = Desviación estándar

\bar{X} = Media

La precisión se demuestra analizando un cierto número de veces la misma solución (placebo cargado). Los experimentos se evalúan a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Para un método espectrofotométrico se acepta menor al 2%.

La precisión de un método se puede evaluar como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por un solo analista usando los mismos aparatos y técnicas (repetibilidad), y como la concordancia obtenida entre las determinaciones efectuadas por diferentes analistas en diferentes días o en diferentes laboratorios utilizando diferentes equipos (reproducibilidad).

1.1.6 Especificidad (selectividad). Es el grado en el cual la medición es debida solo a la sustancia a ser determinada y no a otras sustancias que puedan estar presentes en el material sujeto a análisis. Dependiendo de la aplicación del método se requerirá mayor o menor grado de especificidad, por ejemplo en un método indicativo de estabilidad se requerirá separar y determinar los productos de degradación del activo y los excipientes.

La especificidad consiste en analizar placebos del producto con el método propuesto e identificar las respuestas del (los) activo (s), excipiente (s) en caso de tenerlos y de otras sustancias auxiliares.

Criterios: Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente, y de no ser así, optimizar el método o desarrollar otro.

1.1.7 Exactitud. Es la concordancia entre un valor experimental determinado y el valor de referencia aceptado. La exactitud del método se puede demostrar mediante:

Efecto placebo: Es la exactitud de un método expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones

independientes realizadas por un solo analista en muestras preparadas con la misma cantidad de placebo, añadiendo diferentes cantidades de una solución estándar de la sustancia que se va a determinar a diferentes concentraciones que varían en un intervalo del 60% al 140% del nivel normal de análisis, el valor que se obtenga será equivalente estadísticamente al valor real (100%). Los resultados se evalúan en porcentaje de recuperación de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100 = \text{Porcentaje de recuperación}$$

1.2 Espectroscopía de absorción.

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía dependiendo de la estructura de la sustancia.

La energía se puede proporcionar en forma de energía electromagnética (luz), el tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con la estructura de la misma. La cantidad de radiación absorbida está sujeta así mismo al número de moléculas que interaccionan con la radiación, el estudio de esto, se conoce como espectroscopía de absorción y es una técnica útil, ya que representa sencillez, rapidez, especificidad y sensibilidad.

La radiación electromagnética de la cual la luz visible constituye parte, puede considerarse como energía propagada en forma de ondas, siendo la longitud de onda la distancia lineal desde cualquier punto de la onda, hasta el punto correspondiente de la onda adyacente.

El medio a través del cual pasa la onda varía la longitud de la misma, esto significa que la velocidad de la radiación depende del medio de propagación. El intervalo completo de radiaciones se denomina espectro electromagnético y se ha caracterizado convencionalmente tal como se indica en la tabla I.

Tabla I. Espectro electromagnético

REGIONES	INTERVALOS DE LONG. DE ONDA
Ultravioleta lejano	100 - 200 nm
Ultravioleta	200 - 400 nm
Visible	400 - 750 nm
Infrarrojo cercano	0.75 - 4 nm
Infrarrojo	4 - 25 nm

La medición de la absorción de la radiación ultravioleta y visible proporciona un método para el análisis de especies inorgánicas y orgánicas. La radiación de éstas regiones es de suficiente energía para causar transiciones electrónicas de los electrones de valencias exteriores.

Cuando un átomo o molécula absorbe energía, pasa a un estado de mayor energía o estado excitado. A cada estado excitado puede asignarsele un nivel de energía definido.

Ley de Beer: Beer postuló que la reducción de la energía radiante de un haz de radiación monocromática era proporcional a la intensidad o potencial del haz y a la cantidad de sustancia absorbente en su trayectoria:

$$\log P_0/P = Ebc = A$$

Donde: A = Absorbancia

E = Absortividad molar

c = Concentración

b = Longitud de la celda

Esta ley rige la absorción de todos los tipos de radiación electromagnética. Se utiliza para soluciones, gases y sólidos, se conoce como ley de Lambert-Beer, y se aplica a una solución que contiene más de una clase de sustancias absorbentes, siempre que no haya interacción entre las distintas especies. Para un sistema de múltiples componentes se tiene:

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

$$A_{\text{total}} = E_1bc_1 + E_2bc_2 + \dots + E_nbc_n$$

Muchos sistemas absorbentes siguen la ley de Beer en soluciones diluidas, pero en otras, las absorbancias varían en forma no lineal con respecto a la concentración, esto se conoce como desviaciones de la ley de Beer. Para manejar estos sistemas se requiere una curva de calibración trazada con valores de muestras de concentración conocida, de esta forma una concentración desconocida se puede determinar a partir de la absorbancia de la solución. En la figura N° 1 se presenta una curva de calibración típica.

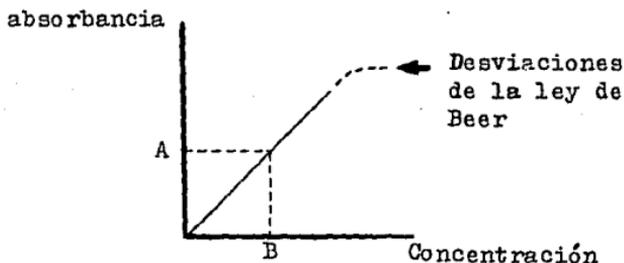


Fig. N° 1. Curva de calibración típica

1.3 Antecedentes respecto a los métodos de análisis.

Existe una gran variedad de métodos de análisis reportados para la DSF, incluyéndose los oficiales (Farmacopeas y normas) y no oficiales.

Las técnicas de cuantificación del principio activo DSF están fundamentadas principalmente en reacciones por grupo funcional.

El grupo funcional con reactividad específica del corticosteroide es el carbonilo del carbono 20, el cual origina muchas reacciones dando como resultado soluciones coloridas, que pueden ser estudiadas por espectrofotometría.

Porter y Silver (16) reportan un método colorimétrico utilizando clorhidrato de fenilhidrazina en medio ácido y calor para formar una hidrazona con absorción máxima a 410 nm.

USP XXI (24) proporciona un método colorimétrico con azul de tetrazolio e hidróxido de tetrametilamonio cuyo producto tiene absorción máxima a 525 nm.

Zakheri (46) reporta otro método por formación de fenilhidrazona con yodo o cloramil, mediante una reacción de complejación de transferencia de carga, determinándose la absorbancia del compuesto en la región del espectro visible.

Zagazig (41) a través de la ruptura oxidativa del carbono 17 con bismutato de sodio en ácido acético y solución amortiguadora de oxalilhidrazina ($\text{pH} = 7$ y iones Cu^{2+})

forma un complejo de color azul con absorción máxima a 610 nm.

La Farmacopea Británica (21) reporta un método de análisis para materia prima por espectrofotometría directa de una solución acuosa, determinándose la absorbancia en la región del espectro ultravioleta a 241 nm. De igual importancia son los métodos enzimáticos (25, 40) que poseen la ventaja de tener una alta sensibilidad, especificidad y exactitud, sin embargo su costo es elevado.

Dentro de las técnicas cromatográficas tenemos principalmente las de cromatografía en capa fina reportadas por Loo (43) y la Farmacopea Nacional (26), en las cuales se cuantifica el esteroide por dicha técnica y posterior determinación espectrofotométrica.

También se encuentran reportadas técnicas por cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), polarimetría y polarografía (34, 35, 42, 44 y 50), que por su alto costo en equipo las hacen inaccesibles.

1.4 Relación estructura-actividad de los esteroides.

Las hormonas esteroidales y sus metabolitos derivan de tres hidrocarburos: el estrano, el androstano y el pregnano. Ellos tienen como característica en común el poseer un núcleo tetracíclico constituido por tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano (1, 19).

El núcleo tetracíclico común a todos los esteroides es un hidrocarburo saturado denominado gonano (fig. N° 2 a), el cual posee 17 átomos de carbono. Si fijamos un sustituyente metilo en la posición 13 pasamos al estrano (fig. N° 2 b), molécula con 18 átomos de carbono, de ésta molécula se derivan las hormonas estrogénicas. Colocando un segundo metilo ahora en la posición 10, obtenemos el hidrocarburo con 19 átomos de carbono, el androstano (fig. N° 2 c), de ésta estructura se derivan las hormonas masculinas. Adicionando un tercer radical, siendo éste un radical etilo en la posición más alta del anillo del ciclopentano sobre el carbono 17 obtenemos un hidrocarburo con 21 átomos de carbono, dos sustituyentes metilo y un grupo etilo, éste hidrocarburo es el pregnano (fig. N° 2 d), este constituye el esqueleto de las hormonas del cuerpo amarillo ovárico y las corticosuprarrenales (19).

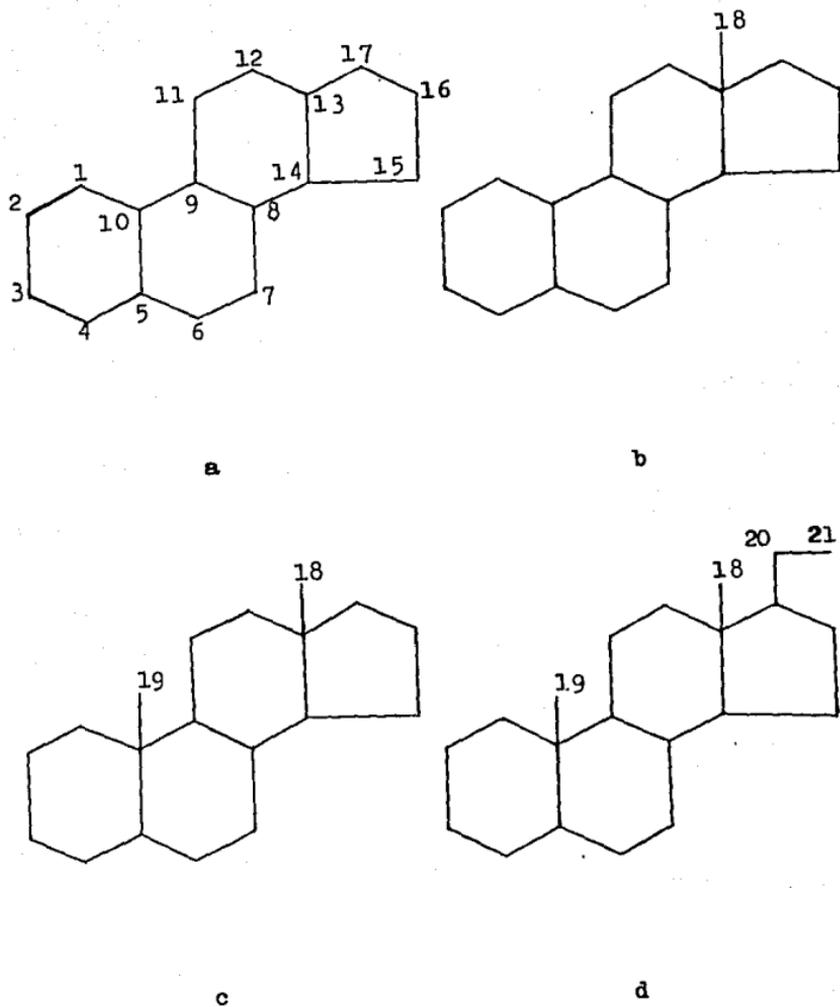


Fig. N° 2. Núcleos tetracíclicos para esteroides

1.5 Propiedades farmacológicas de la DSF.

La DSF está clasificada dentro de los corticosteroides con acción predominante de glucocorticoide, análogo del cortisol y derivado "fluorado" de la prednisolona. Es uno de los esteroides sintéticos de mayor actividad antiinflamatoria y antialérgica, siendo su potencia aproximadamente 25 veces mayor que la del cortisol para ese efecto, pero su actividad mineralocorticoide es prácticamente nula. Se considera que la presencia de fluor en su molécula contribuye a su potencia antiinflamatoria. Las dosis equivalentes (potencia relativa) para los efectos antiinflamatorios entre varios corticosteroides son los siguientes: cortisol = 20 mg; prednisolona = 5 mg; metilprednisolona = 4 mg; parametasona = 2 mg; DSF = 0.75 mg. Los análogos sintéticos del cortisol como la DSF son eficaces por vía oral y parenteral (2, 3, 6).

La absorción a partir de los sitios de aplicación local puede ser suficiente para producir efectos sistémicos incluyendo la supresión suprarrenal cuando se administra crónicamente o sobre una gran extensión de la piel (3, 4, 5).

La bioinactivación de DSF se produce de manera similar que con el cortisol, mediante la reducción de la doble ligadura entre los carbonos 4 y 5 del anillo A del núcleo esteroideal y la consiguiente formación de sulfatos o glucurónidos. Al parecer, la doble ligadura entre los carbonos 1 y 2 permiten que este medicamento tenga una vida

media biológica prolongada, entre 36 y 72 horas (4, 6).

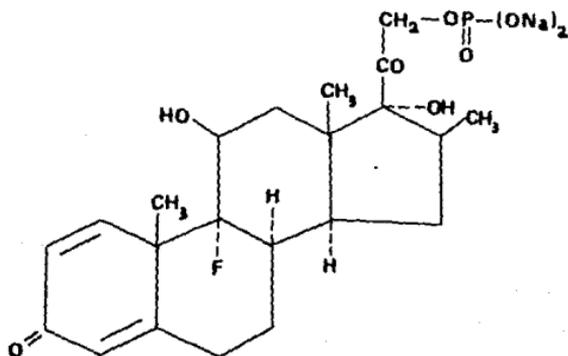
Indicaciones: En general, la DSF tiene el uso de los glucocorticoides, principalmente por su efecto antiinflamatorio, siendo uno de los medicamentos más útiles en el tratamiento de inflamaciones corneales, ya que después de su administración tópica penetra a la córnea y al humor acuoso. También resulta útil en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades de la colágena, dermatosis alérgica y de la piel, en algunas leucemias, linfomas y anemias hemolíticas, de la misma forma en inflamaciones del tejido blando y en situaciones de emergencia incluyendo el asma bronquial (6, 7).

Entre los diferentes tipos de compuestos con estructura esteroideal se encuentran: Hormonas adrenocorticales que provienen de la corteza de las glándulas adrenales que se localizan en la parte superior de cada riñón (1, 2 y 5), estas glándulas producen seis hormonas importantes y son: cortisona, cortisol, corticosterona, desoxicorticosterona, dehidrocorticosterona y $17\text{-}\alpha$ -hidroxicorticosterona, las cuales tienen como función:

- a) Regular el metabolismo de carbohidratos y proteínas.
- b) Regular el metabolismo de minerales, sales y agua
- c) Como función farmacológica tienen un efecto antiinflamatorio.
- d) Influyen en el desarrollo sexual.

1.6 Dexametasona-21-sodio-fosfato.

Fórmula estructural:

Fórmula mínima: $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$

Peso Molecular: 516.40

Nombre oficial: Dexametasona-21-sodio-fosfato

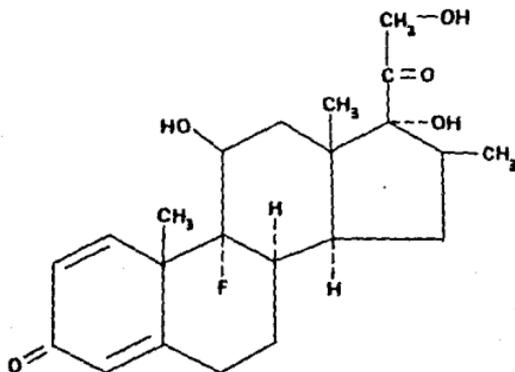
Nombres químicos: ●Pregna-4-eno-3,20-diona-9-fluoro-11,17-dihidroxi-16-metil-21-(fosfonoxi)-sal disódica-(11 β 16 α).

●9-fluoro-11 β ,17, 21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona-21-(dihidrógenofosfato)-sal disódica.

- Descripción:** Polvo cristalino, inodoro o con ligero olor a alcohol, ligeramente amarillento, excesivamente higroscópico. Contiene no menos que el 96% y no más del 102% de $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$ calculado sobre la base libre de agua y alcohol.
- Rotación específica:** $(\alpha)_D^{25} + 57$ en agua
- Punto de fusión:** 233-235 °C
- pH:** Una solución al 1% en agua tiene un pH = 7.5-10.5 .
Una solución al 6.75% es isosmótica.
- Solubilidad:** Muy soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol (etanol), muy ligeramente soluble en hexano, insoluble en cloroformo y en éter.
- Espectro ultravioleta:** Presenta una absorción máxima al U.V. a 238 nm en etanol (E 14000). Presenta una absorción máxima a 241 nm al U.V. en agua.

1.7 Dexametasona base.

Fórmula estructural:

Fórmula mínima: $C_{22}H_{29}FO_5$

Peso molecular: 392.50

Nombres químicos: •9-fluoro-11,17,21-trihidroxi-16-metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona.

•Pregna-1,4-dieno-3,20-diona-9-fluoro-11,17,21-trihidroxi-16-metil-(11 β 16 α).

•9 α -fluoro-16-metilprednisolona.

•1-dehidro-16 α -metil-9 α -fluorohidro cortisona.

Nombres registrados: Decasone; Decadron; Deronil; Dg
soxine; Dexasone; Hexadecadrol;
Fluormone; Anaflogistico.

Descripción: Polvo cristalino blanco o casi
blanco, inodoro, estable al
aire. Contiene no menos del
97% y no más del 102%, calcula-
do sobre la sustancia seca.

Punto de fusión: 268-271 °C

Rotación específica: $(\alpha)_D^{25} + 72$, en dioxano.

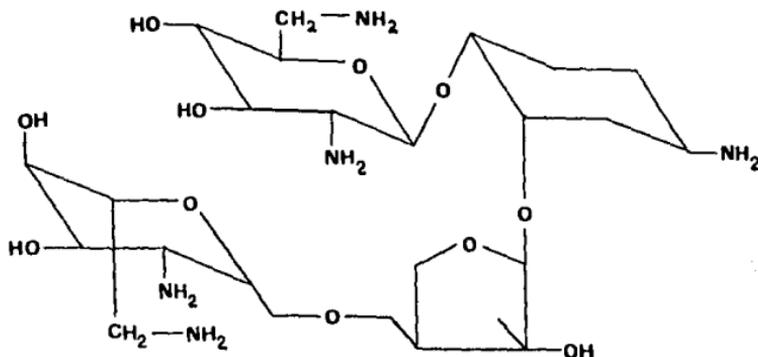
Solubilidad: Agua (37°C) 11.6 mg/100 ml,
(25°C) 10.0 mg/100 ml; mirista-
to de isopropilo (37°C) 23.3
mg/100 ml; etanol 1 en 42; clo-
roformo 1 en 165; acetona solu-
ble; acetato de etilo (25°C)
4.10 mg/ml; éter muy ligeramen-
te soluble.

Espectro ultravioleta: Presenta una absorción máxima al U.V. a 240 nm en metanol (E 1 cm.-1% 355).

Estabilidad: La dexametasona sólida es estable al aire, pero debe ser protegida de la luz. Sus soluciones pierden el 50% del C-17 del cetol de la cadena en 6 - 8 minutos con la presencia de una base catalítica.

1.8 Sulfato de neomicina.

Fórmula estructural:

Fórmula mínima: $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$

Peso molecular: 614.67

Nombre químico: •Sulfato de neomicina

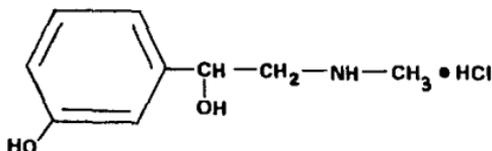
Nombres registrados: Micifradin; Miacine; Fradiomicin

Descripción: Se presenta como un polvo blanco amorfo.

Solubilidad: En mg/ml: en agua = 6.3; en metanol = 0.225; en etanol = 0.095; en isopropanol = 0.082; en ciclohexano 0.08; en benceno = 0.050; prácticamente insoluble en acetona, éter y cloroformo.

1.9 Clorhidrato de fenilefrina.

Fórmula estructural:

Fórmula mínima: $C_{19}H_{13}NO_2 \cdot HCl$

Peso molecular: 203.67

Nombre químico: •Clorhidrato de 1-m-hidroxi- α -(metilamino)-metilbencil alcohol

Nombres registrados: Clorhidrato de 1-1-(m-hidroxifenil)-2-metilaminoetanol.

Clorhidrato de neosinefrina.

Clorhidrato de Isofrina.

Descripción: Polvo blanco o casi blanco cristalino, con sabor amargo.

pH: La solución acuosa al 1% tiene un pH = 5; La solución acuosa al 3% es isosmótica con el suero.

Rotación específica: $(\alpha)_D^{25}$ -46.2 a -47.2

Punto de fusión: 140°C - 145°C (Clorhidrato)
170°C - 177°C (Base)

Solubilidad: 1 en 2 de agua
1 en 4 de alcohol
1 en 2 de glicerina

Espectro ultravioleta: (Espectrofotómetro Perkin-Elmer UV 571), concentración de 0.5 mg/ml. Absorción máxima (nm): metanol= 250, 256 y 262
HCl 0.1N= 250, 256 y 262; NaOH 0.1N= 251, 257 y 263.

Incompatibilidades: No es compatible con butacaína álcalis, sales férricas, agentes oxidantes y fenitoína de sodio.

Estabilidad: Coloraciones amarillas de las soluciones de fenilefrina indican una degradación, forma compuestos auto-oxidables con metales pesados.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La forma farmacéutica en solución es utilizada para administrar una gran cantidad de fármacos principalmente antibióticos, vasoconstrictores, antialérgicos y corticosteroides. La DSF se expende en el mercado en diferentes formas, siendo las soluciones nasal y oftálmica dos de las más solicitadas por parte del público consumidor, sobre todo aquellas personas con problemas de infecciones oculares y vías respiratorias. Generalmente tanto la solución nasal como la oftálmica vienen dosificadas en envases de plástico provistos de un gotero para facilitar su manejo y administración.

Para cuantificar dicho principio activo en las dos soluciones ya mencionadas, existen métodos analíticos muy sensibles, exactos y reproducibles, pero a la vez muy caros y poco accesibles para un laboratorio ordinario (25, 26, 34 y 35), y en otros existen interferencias debidas a los excipientes de éstas formulaciones (31, 33 y 45). Razón por la cual se requiere desarrollar un método analítico para ambas formulaciones que cumpla con: Pocas manipulaciones de la muestra desde el inicio hasta el final del estudio; que el principio activo sea fácilmente identificable con un tiempo reducido de análisis; que la muestra a analizar sea mínima y no se requiera algún equipo nuevo o reactivos poco accesibles.

3. OBJETIVOS

a) Desarrollar un método analítico para el principio activo dexametasona-21-sodio-fosfato por espectrofotometría U.V., para soluciones farmacéuticas (nasal y oftálmica), fundamentándose en sus propiedades físicas y químicas.

b) Realizar la validación del método seleccionado y desarrollado, evaluando los siguientes parámetros:

- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Precisión {
 - Repetibilidad
 - Reproducibilidad
- Exactitud
- Linealidad del método

4. HIPOTESIS

Dexametasona-21-sodio-fosfato (DSF) es un corticosteroide que en solución acuosa presenta absorción máxima en la región del espectro ultravioleta a 241 nm. , y la base libre (dexametasona base), absorbe a la misma longitud de onda, pero en un disolvente orgánico, por lo anterior, el método desarrollado será específico para este principio activo, debido a sus características de solubilidad, coeficiente de reparto y polaridad.

El método propuesto será específico, lineal, exacto, preciso y económico para ambas soluciones farmacéuticas.

5. FORMULACIONES

5.1 Formulación de la dexametasona-21-sodio-fosfato en solución oftálmica.

Frasco con tapón gotero de 10 ml, cada 100 ml contienen:

Dexametasona-21-sodio-fosfato equivalente a . . . 91 mg de fosfato de dexametasona.	
Sulfato de neomicina equivalente a 350 mg de neomicina base.	
Vehículo acuoso c.b.p. 100 ml	

5.2 Formulación de la dexametasona-21-sodio-fosfato en solución nasal.

Frasco con tapón gotero de 15 ml, cada 100 ml contienen:

Dexametasona-21-sodio-fosfato.0.05 g	
Sulfato de neomicina equivalente a0.35 g de neomicina base.	
Clorhidrato de fenilefrina. 0.50 g	
Vehículo acuoso c.b.p.100 ml	

6. MATERIAL

Solución oftálmica

Equipo:

- Balanza analítica modelo H 45 Mettler, capacidad máxima = 160 g; capacidad mínima = 0.0001 g.
- Espectrofotómetro Beckmann 25 (con graficador).
- Potenciometro Beckmann modelo 21
- Parrilla de calentamiento y agitación modelo 14.

Material de vidrio:

- Matraces volumétricos de 100 ml, 50 ml y 25 ml.
- Pipetas volumétricas de 5 ml y 1 ml.
- Vasos de precipitados de 150 ml y 250 ml.
- Barra de agitación magnética de 1 pulgada.

Solución nasal

Equipo:

- Balanza analítica modelo H 45 Mettler, capacidad máxima = 160 g; capacidad mínima = 0.0001 g.
- Espectrofotómetro Beckmann 25 (con graficador).
- Parrilla de calentamiento y agitación modelo 14
- Termómetro de -20 a 150 °C.

Material de vidrio:

- Matraces volumétricos de 100 ml y 1 ml.
- Pipetas volumétricas de 10 ml, 5 ml, 2 ml y 1 ml.
- Probeta de 25 ml
- Embudos de vidrio de tallo corto.

- Matraces bola de 50 ml 24/40.
- Refrigerantes rectos 24/40.
- Embudos de separación de 250 ml.
- Vasos de precipitados de 250 ml y 150 ml.
- Barra de agitación magnética de 1 pulgada.
- Soportes universales.
- Pinzas para refrigerante 24/40.

Reactivos:

- Acido clorhidrico 5N (grado reactivo), Merk
- Cloroformo (grado espectro), Merk
- Sulfato de sodio (grado reactivo), Merk

7. METODOLOGIA

La parte experimental está dividida en dos partes principales:

a) Desarrollo del método de análisis por espectrofotometría U.V. para la cuantificación de DSF en una solución nasal y en una solución oftálmica.

b) Validación del método analítico seleccionado para cada solución.

Para iniciar el estudio y con ello, alcanzar los objetivos, se estudiaron las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los principios activos y excipientes de la formulación de la solución nasal y de la oftálmica.

De los métodos de cuantificación reportados en la literatura, se seleccionaron aquellos que no requerían de equipo, reactivos y/o condiciones especiales, además que fueran accesibles al laboratorio y que requirieran de un tiempo de análisis corto.

Los métodos seleccionados que se ajustaron a lo anterior fueron:

- Técnica analítica con azul de tetrazolio (33)
- Técnica analítica con clorhidrato de fenilhidrazina (16, 45)
- Técnica analítica de cuantificación directa por espectrofotometría U.V. (20)

7.1 Método desarrollado para la solución oftálmica.

Preparación del estándar: Pesar con exactitud el equivalente a 20 mg de dexametasona-21-sodio-fosfato y transferirlo a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar agua hasta disolver aforando hasta la marca, tomar 5 ml de ésta solución con una pipeta volumétrica, y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, aforándolo con agua destilada hasta la marca.

Preparación de la muestra: Transferir 1 ml de la solución oftálmica a un matraz volumétrico de 100 ml aforando con agua destilada hasta la marca, obteniendo así una solución de la misma concentración que el estándar.

Leer la solución del estándar y la solución del problema en la región ultravioleta a 241 nm, utilizando agua destilada como blanco.

7.2 Método desarrollado para la solución nasal.

Adicionar en un matraz bola de 50 ml, 2 ml de la solución nasal sujeta a análisis y en otro matraz bola de 50 ml, 2 ml de estándar de DSF (solución de 50 mg/100ml), y 10 ml de ácido clorhídrico 5N en cada matraz.

Conectar en cada uno de los matraces bola (estándar y problema), un refrigerante recto 24/40 y calentar suavemente a ebullición (85-90°C) en una parrilla de calentamiento por un período de 90 minutos.

Una vez terminado el tiempo de reflujo, enjuagar por la parte de arriba cada refrigerante con agua destilada, aproximadamente 10 ml, y enfriar los matraces a chorro de agua.

Transferir las muestras a embudos de separación de 250 ml, enjuagando los matraces con 20 ml de cloroformo cada uno, transfiriendo este al embudo correspondiente.

Agitar los embudos por un período de 5 minutos y recolectar el primer extracto clorofórmico de cada embudo en matraces volumétricos de 100 ml, pasándolo antes en un embudo de separación de humedad con sulfato de sodio.

Adicionar a la fase acuosa de cada embudo 20 ml de cloroformo dos veces más, para completar de la misma manera tres extractos, recolectándolos en los matraces correspondientes.

Aforar cada uno de los matraces con cloroformo, y determinar el espectro de absorción por medio de un barrido en la región ultravioleta de 260-157nm, y su absorbancia a 241 nm utilizando cloroformo como blanco.

Obtener el porcentaje de principio activo dexametasona 21-sodio-fosfato (equivalente a dexametasona base) presente en la solución nasal, utilizando la absorbancia del estándar y del problema, sus concentraciones y la pureza del estándar.

8. VALIDACION DEL METODO ANALITICO DESARROLLADO PARA LA SOLUCION OPTALMICA

8.1 Especificidad del método.

Se procede a preparar las siguientes soluciones:

- Solución oftálmica (dilución 1:100)
- Solución de cloruro de benzalconio (90 $\mu\text{g/ml}$)
- Solución estándar de DSF (10 $\mu\text{g/ml}$)
- Solución placebo

Determinar la especificidad del método por medio de un análisis espectrofotométrico realizando un barrido al U.V. entre 260-157 nm de cada una de las soluciones anteriores, utilizando agua como blanco, para obtener los espectros de absorción.

8.2 Linealidad del sistema.

Se pesaron 20 mg de DSF estándar, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, se agregó agua para disolver y se llevó a la marca del aforo.

Se tomaron por sextuplicado las siguientes partes de alícuotas: 3, 4, 5, 6 y 7 ml, se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó agua destilada hasta la marca del aforo y se agitó.

Se determinó la absorbancia de cada solución a 241 nm, utilizando agua destilada como blanco.

Obtener la gráfica de linealidad del sistema para la cuantificación de la DSP en una solución oftálmica.

8.3 Precisión, exactitud y linealidad del método.

Se elaboraron tres lotes piloto al 85, 100 y 115% con respecto al principio activo DSP, siguiendo la misma metodología, con seis repeticiones para cada concentración.

8.4 Reproducibilidad.

Se realizó el método analítico descrito como método desarrollado, preparando por triplicado lotes piloto al 100% con respecto al principio activo DSP, por dos análisis en dos diferentes días.

9. VALIDACION DEL METODO ANALITICO DESARROLLADO PARA LA
SOLUCION NASAL

9.1 Especificidad del método.

- Análisis por espectrofotometría U.V. para la solución nasal y sus componentes: Se procede a preparar las siguientes soluciones:

- a) Solución nasal (dilución 2:100)
- b) Solución acuosa de clorhidrato de fenilefrina 5 mg/ml
- c) Solución acuosa de DSF 10 µg/ml

Realizar un barrido en la región U.V. (260-157 nm), para cada una de las soluciones anteriores utilizando agua como blanco, y obtener una curva Abs. Vs. Longitud de onda, determinando así la posible existencia de interferencias debidas a los excipientes de la formulación que pudieran afectar la cuantificación directa del principio activo DSF por espectroscopía U.V.

- Análisis por espectrofotometría U.V. para DSF y dexametasona base: Se procede a preparar las siguientes soluciones:

- a) Solución acuosa de DSF 10 µg/ml
- b) Solución clorofórmica de dexametasona base 10 µg/ml

Realizar un barrido en la región U.V. (260-157 nm) para cada una de las soluciones anteriores utilizando agua y cloroformo como blanco respectivamente, y obtener una curva Abs. Vs. Longitud de onda, determinando los parámetros descritos en el anterior análisis.

9.2 Linealidad del sistema.

Se realizó el procedimiento descrito anteriormente como método desarrollado, analizando seis muestras para cada una de las siguientes cantidades agregadas en forma de solución estándar: 6, 8, 10, 12 y 14 µg.

9.3 Precisión, exactitud y linealidad del método.

Se elaboraron tres lotes piloto al 85, 100 y 115% con respecto al principio activo DSF, siguiendo la misma metodología, con seis repeticiones para cada concentración.

9.4 Reproducibilidad.

Se realizó el método analítico descrito anteriormente como método desarrollado, preparando por triplicado lotes piloto al 100% con respecto al principio activo DSF, por dos analistas en dos diferentes días.

RESULTADOS

SOLUCION

OFTALMICA

10. RESULTADOS

10.1 Solución oftálmica.

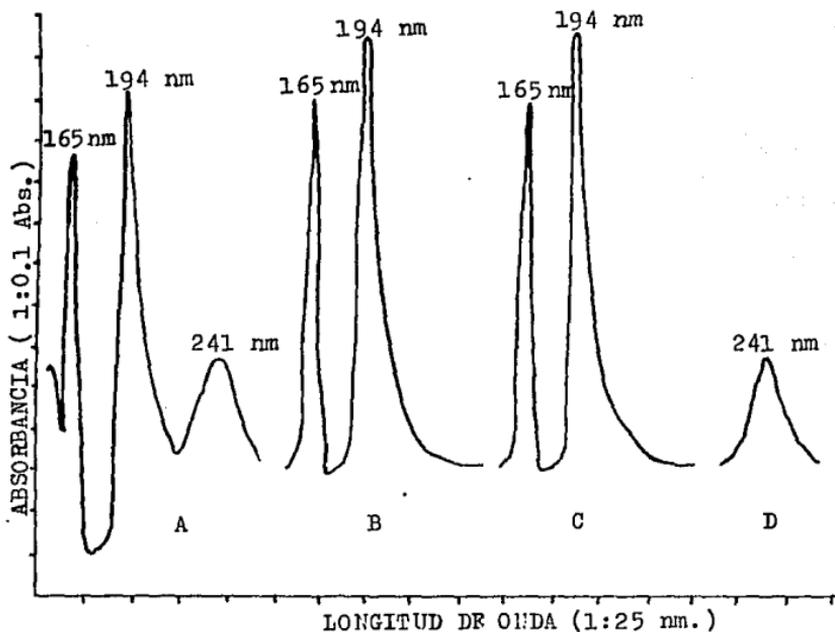


Fig. N° 3 Espectros de absorción U.V. para la especificidad del método de la solución oftálmica.

- A = Solución oftálmica (dilución 1:100)
- B = Solución acuosa de cloruro de benzalconio 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- C = Solución placebo
- D = Solución acuosa de Dexametasona-21-sodio-fosfato 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Como se observa a 241 nm solo absorbe la DSF, por lo que el método es específico.

TABLA N° II RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA
PARA LA SOLUCION OFTALMICA

Cantidad agregada (μg)	Cantidad recuperada (μg)	% Recuperación
6	5.954	99.23
6	5.922	98.70
6	6.019	100.31
6	5.987	99.78
6	5.987	98.78
6	6.084	101.40
8	8.090	101.12
8	8.155	101.93
8	8.123	101.53
8	8.155	101.93
8	8.187	102.33
8	8.123	102.33
10	10.032	100.32
10	9.935	99.35
10	9.967	99.67
10	10.032	100.32
10	10.032	100.32
10	10.000	100.00
12	12.006	100.05
12	11.974	99.78
12	12.071	100.59
12	12.071	100.59
12	12.103	100.85
12	12.095	100.79
14	14.012	100.08
14	14.077	100.55
14	14.057	100.40
14	14.045	100.32
14	14.077	100.55
14	14.012	100.08

CALCULOS PARA LA EVALUACION ESTADISTICA DE LA LINEALIDAD
DEL SISTEMA PARA LA SOLUCION OFTALMICA

- Inferencia para la ordenada al origen (A):

Como:	Ho: $A_0 = 0$	
	Ha: $A_0 \neq 0$	
Con: $\bar{X} = 10$	$\Sigma X = 300$	$S_{y/x} = 0.1293$
$S_x = 2.8767$	$\Sigma X^2 = 3240$	$\hat{S}_{y/x} = 0.1339$
$r = 0.9997$	$\Sigma XY = 3254.626$	$t_{A_0} = 0.4453$
$B = 1.0007$	$\Sigma Y = 301.4440$	$\alpha = 0.0500$
$A = 0.0400$	$\Sigma Y^2 = 3269.464$	$g.l. = 28$

Area de aceptación:

$$-2.05 < 0.4453 < 2.05$$

Intervalo de confianza:

$$0.040 \pm 0.17788$$

Por lo tanto se acepta Ho y nuestra ordenada al origen es igual a cero.

- Inferencia para la pendiente (B):

Como:	Ho: $B_0 = 1$	
	Ha: $B_0 \neq 1$	
Con:	$t_{B_0} = 0.081$	

Area de aceptación:

$$-2.05 < 0.081 < 2.05$$

Intervalo de confianza:

$$1.0007 \pm 0.0177$$

Por lo tanto se acepta Ho y nuestra pendiente es igual a uno.

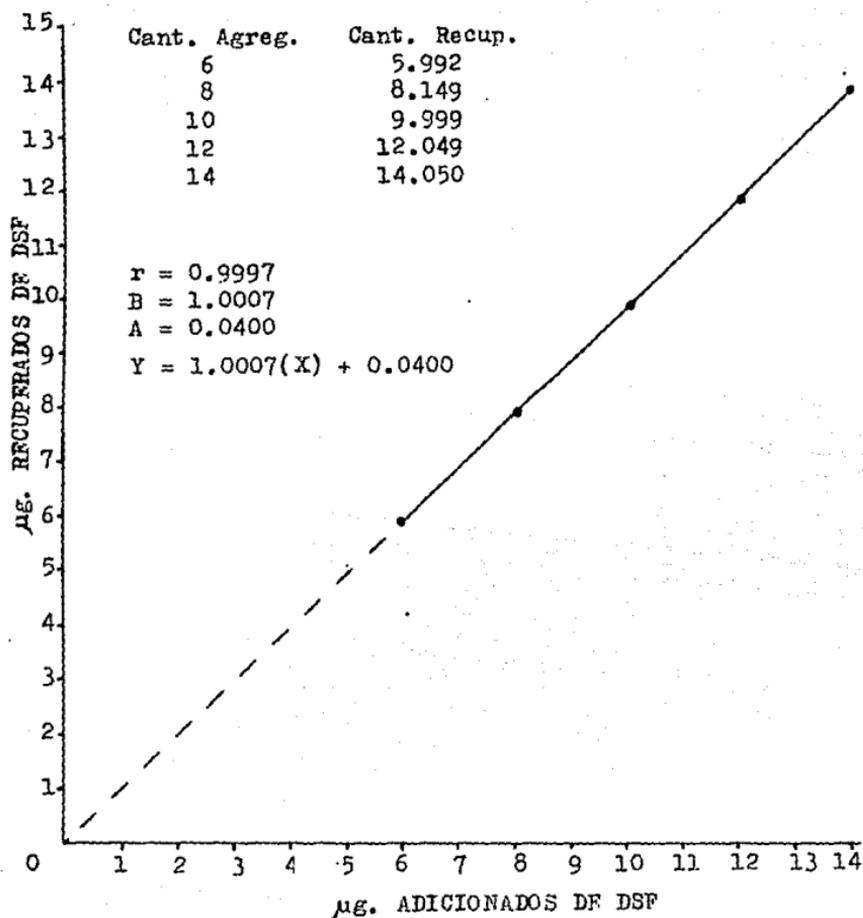


Fig. N° 4 Gráfica de la linealidad del sistema para la cuantificación de la DSF en una solución oftálmica.

TABLA N° III RESULTADOS DE LA PRECISION, EXACTITUD
 Y LINEALIDAD DEL METODO PARA LA SOLU-
 CION OFTALMICA

Cantidad agregada (μg)	Cantidad recuperada (μg)	% Recuperación
8.500	8.539	100.459
8.500	8.506	100.070
8.500	8.241	96.952
8.500	8.539	100.459
8.500	8.441	99.306
8.500	8.506	100.070
10.000	9.967	99.670
10.000	10.000	100.000
10.000	10.032	100.320
10.000	9.867	99.670
10.000	10.032	100.320
10.000	10.065	100.650
11.500	11.393	99.069
11.500	11.461	99.660
11.500	11.526	100.226
11.500	11.526	100.226
11.500	11.493	99.939
11.500	11.658	101.373

CALCULOS PARA LA EVALUACION DE LA PRECISION

Como: $H_0: \sigma \leq 1.5\%$
 $H_a: \sigma > 1.5\%$

Con: $n = 18$
 $S = 1.2837$
 $\chi_{\text{Calc.}} = 10.748$
 $\alpha = 0.050$
 $g.l. = 17$

Area de aceptación:

$$7.564 < 12.439 < 30.191$$

Intervalo de confianza:

$$0.2983 < \sigma < 0.5960$$

Por lo tanto el método resulta preciso.

Como: $C.V. \leq 2\%$

Donde: $C.V. = \text{Coeficiente de variación}$

Con: $S_{\% \text{recup.}} = 0.9037$
 $\bar{X}_{\% \text{recup.}} = 99.9132$

$C.V. = 0.9045\%$

Por lo tanto el método es repetible.

CALCULOS PARA LA EVALUACION DE LA EXACTITUD

Como: $H_0: = \bar{X} = 100\%$
 $H_a: = \bar{X} \neq 100\%$

Con: $\bar{X} = 100.044$
 $S = 1.28370$
 $t_{Calc.} = 0.01598$
 $\alpha = 0.050$
 $g.l. = 17$

Area de aceptación:

$$-2.1098 < 0.01598 < 2.1098$$

Intervalo de confianza:

$$100.044 \pm 0.1977$$

Por lo tanto el método resulta exacto.

CALCULOS PARA LA EVALUACION DE LA LINEALIDAD

- Inferencia para la ordenada al origen (A):

Como:	Ho: $A_0 = 0$		
	Ha: $A_0 \neq 0$		
Con: $\bar{X} = 10$	$\Sigma X = 180$	$Sy/x = 0.08266$	
$Sx = 1.2831$	$\Sigma X^2 = 1327$	$\hat{S}y/x = 0.08767$	
$r = 0.9976$	$\Sigma XY = 1825.34$	$t_{A_0} = 0.36030$	
$B = 1.0158$	$\Sigma Y = 179.79$	$\alpha = 0.050$	
$A = -0.169$	$\Sigma Y^2 = 1823.83$	$G.L. = 16$	

Area de aceptación:

$$-2.12 < 0.9989 < 2.12$$

Intervalo de confianza:

$$-0.1690 \pm 0.1699$$

Por lo tanto se acepta H_0 y nuestra ordenada al origen es igual a cero.

- Inferencia para la pendiente (B):

Como:	Ho: $B_0 = 1$
	Ha: $B_0 \neq 1$
Con:	$t_{B_0} = 0.9829$

Area de aceptación:

$$-2.12 < 0.9829 < 2.12$$

Intervalo de confianza:

$$1.01580 \pm 0.03513$$

Por lo tanto se acepta H_0 y nuestra pendiente es igual a uno.

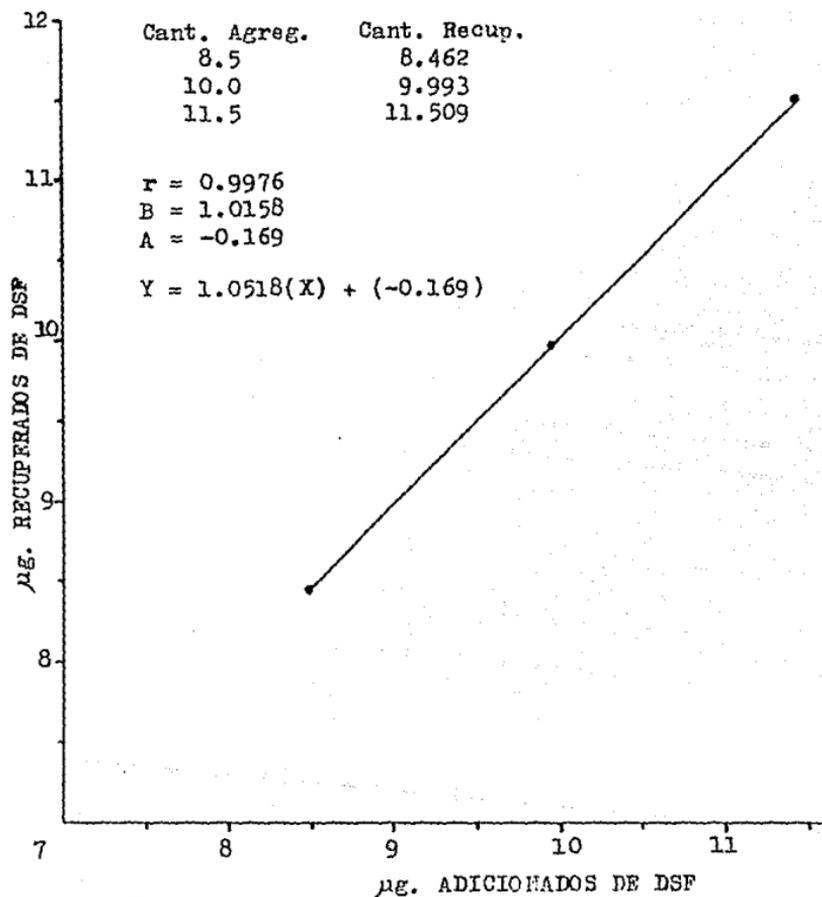


Fig. N° 5 Gráfica de la linealidad del método para la cuantificación de la DSF en una solución oftálmica.

TABLA N° IV RESULTADOS DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL
METODO PARA LA SOLUCION OPTALMICA

	Analista 1	Analista 2
	99.97	99.87
Día 1	99.97	99.53
	98.86	99.87
	99.91	99.97
Día 2	99.91	99.91
	99.57	99.61

$$\frac{\sum_{i=1}^a Y_{i..}^2}{br} = 119390.80$$

$$\frac{Y_{...}^2}{abr} = 119390.78$$

$$\frac{\sum_{j=1}^b Y_{.j.}^2}{ar} = 119390.83$$

$$\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij.}^2}{r} = 119390.87$$

$$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r Y_{ijk} = 119391.92$$

TABLA N° V ANADEVA PARA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO
PARA LA SOLUCION OPTALMICA

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal.	Ftab. (0.95)
Analista	1	0.02	0.02	1.000	161.14
Día	1	0.05	0.05	0.384	5.32
Interac- ción ana- lista-día	1	0.02	0.02	0.153	5.32
Error	8	1.05	0.13		

Por lo tanto no existe efecto por analista, efecto por día, ni efecto por interacción analista-día.

R E S U L T A D O S

S O L U C I O N

N A S A L

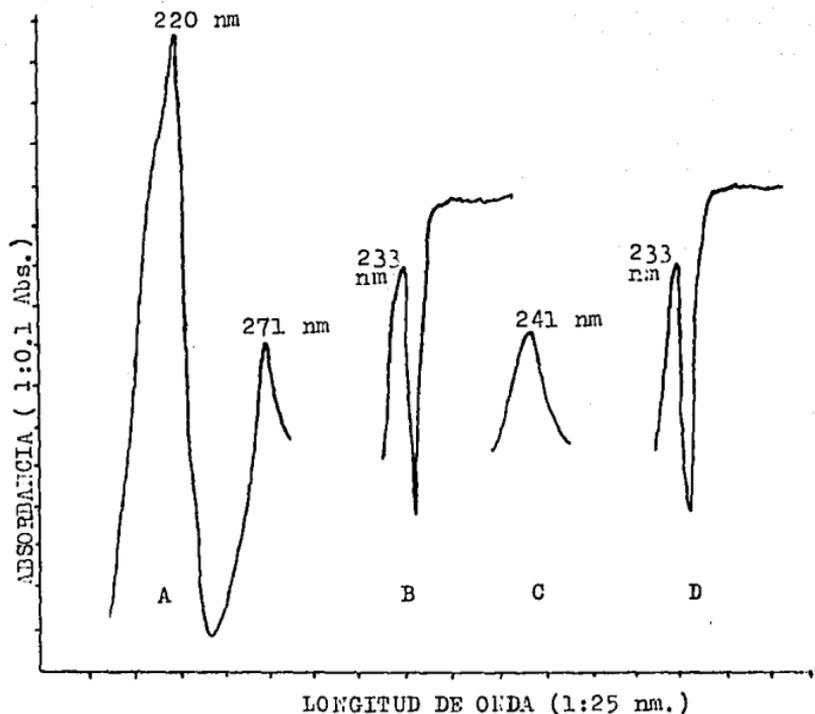
10.2 Solución nasal.

Fig. N° 7 Espectros de absorción U.V. para la especificidad del método de la solución nasal.

A = Solución nasal (dilución 2:100)

B = Solución acuosa de clorhidrato de fenilefrina
5 mg/ml

C = Solución acuosa de DSF 10 µg/ml

D = Solución placebo

Blanco = Agua destilada

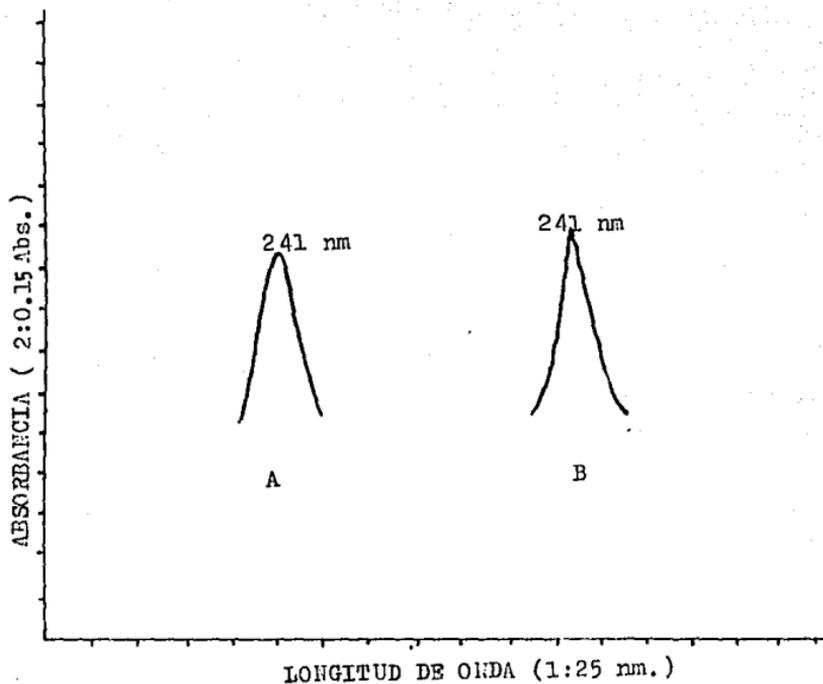


Fig. N° 8 Espectros de absorción U.V. para la especificidad del método de la DSF y la dexametasona base.

- A = Solución acuosa de DSF 10 $\mu\text{g/ml}$ (Blanco = Agua)
- B = Solución clorofórmica de dexametasona base 10 $\mu\text{g/ml}$ (Blanco = Cloroformo)

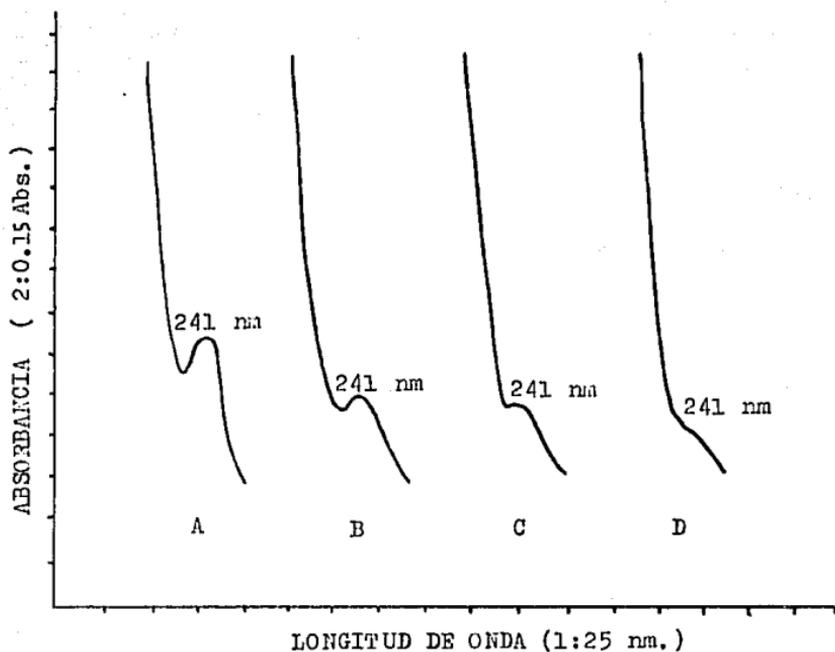


Fig. N° 9 Espectros de absorción U.V. para las fases acuosas del método por hidrólisis de la solución nasal.

- A = HCl 1 N; Tiempo de reflujo = 15 minutos
- B = HCl 1 N; Tiempo de reflujo = 60 minutos
- C = HCl 1 N; Tiempo de reflujo = 90 minutos
- D = HCl 5 N; Tiempo de reflujo = 90 minutos

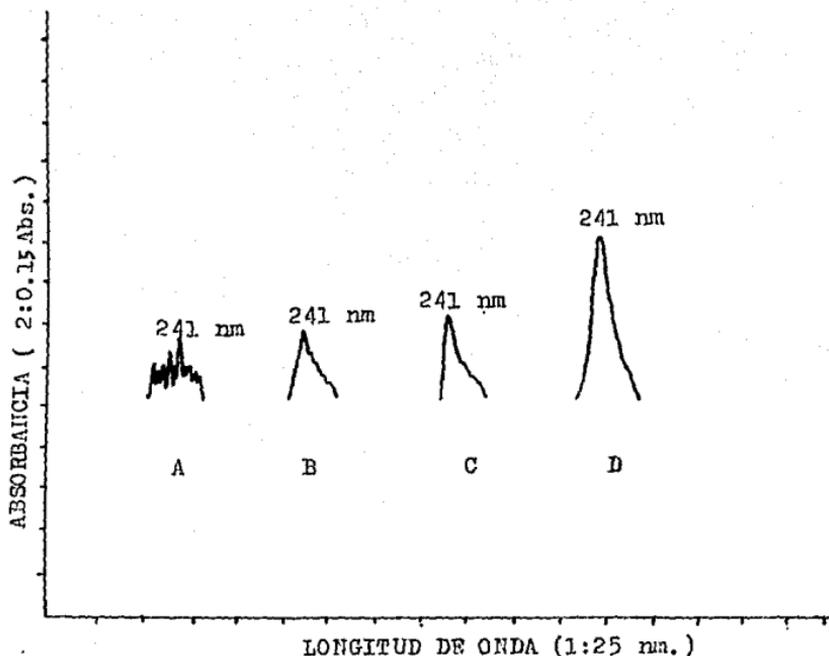


Fig. N° 10 Espectros de absorción U.V. para las fases orgánicas del método por hidrólisis de la solución nasal.

- A = HCl 1 N; Tiempo de reflujo = 15 minutos
 B = HCl 1 N; Tiempo de reflujo = 60 minutos
 C = HCl 1 N; Tiempo de reflujo = 90 minutos
 D = HCl 5 N; Tiempo de reflujo = 90 minutos

TABLA N° VII RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA
PARA LA SOLUCION NASAL

Cantidad agregada (μg)	Cantidad recuperada (μg)	% Recuperación
6	5.959	99.31
6	6.010	100.16
6	5.959	99.31
6	6.010	100.16
6	6.010	100.16
6	5.909	98.48
8	7.929	99.11
8	8.080	101.00
8	8.030	100.37
8	7.929	99.11
8	7.979	99.75
8	8.030	100.37
10	10.102	101.02
10	10.050	100.50
10	10.000	100.00
10	9.949	99.49
10	10.102	101.02
10	9.898	98.98
12	12.020	100.16
12	11.969	99.74
12	12.020	100.16
12	11.969	99.74
12	12.070	100.58
12	11.919	99.32
14	14.761	105.43
14	13.989	99.92
14	14.040	100.28
14	14.040	100.28
14	13.989	99.92
14	14.040	100.28

CALCULOS PARA LA EVALUACION ESTADISTICA DE LA LINEALIDAD
DEL SISTEMA PARA LA SOLUCION NASAL

- Inferencia para la ordenada al origen (A):

Como:	Ho: $A_0 = 0$		
	Ha: $A_0 \neq 0$		
Con:	$X = 10$	$\Sigma X = 300$	$Sy/x = 0.1691$
	$Sx = 2.8767$	$\Sigma X^2 = 3240$	$\hat{S}y/x = 0.1750$
	$r = 0.9988$	$\Sigma XY = 3251.898$	$t_{A_0} = -1.660$
	$B = 1.0157$	$\Sigma Y = 300.811$	$\alpha = 0.0500$
	$A = -0.1308$	$\Sigma Y^2 = 3264.464$	$g.l. = 28$

Area de aceptación:

$$-2.05 < -1.660 < 2.05$$

Intervalo de confianza:

$$-0.1308 \pm 0.1615$$

Por lo tanto se acepta H_0 y nuestra ordenada al origen es igual a cero.

- Inferencia para la pendiente (B):

Como:	Ho: $B_0 = 1$
	Ha: $B_0 \neq 1$
Con:	$t_{B_0} = 1.3893$

Area de aceptación:

$$-2.05 < 1.3893 < 2.05$$

Intervalo de confianza:

$$1.0157 \pm 0.0231$$

Por lo tanto se acepta H_0 y nuestra pendiente es igual a uno.

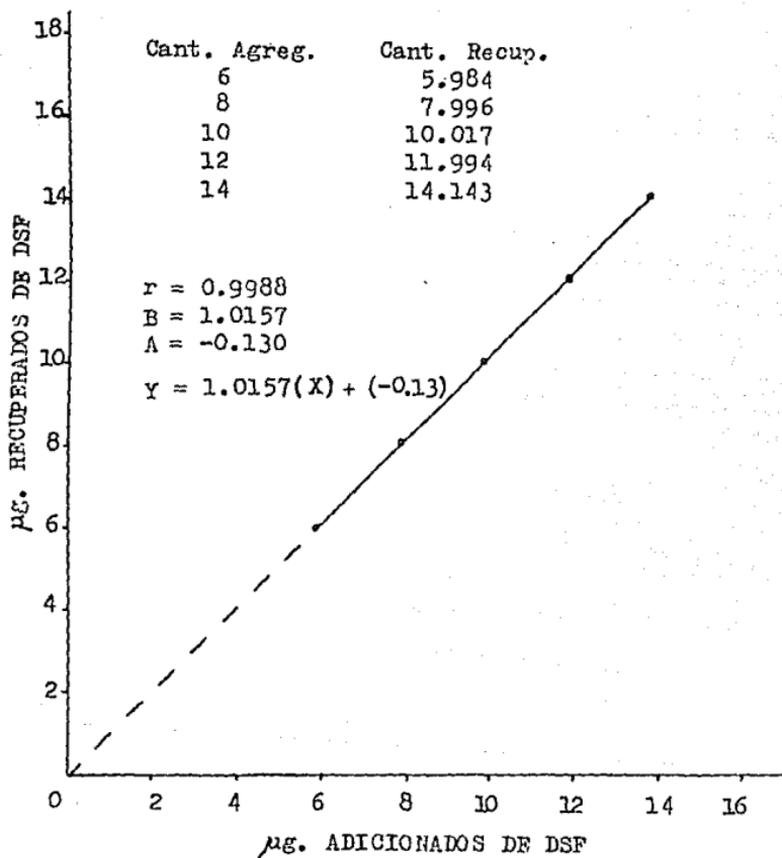


Fig. N° 11 Gráfica de la linealidad del sistema para la cuantificación de la dexametazona base en una solución nasal.

TABLA N° VIII RESULTADOS DE LA PRECISION, EXACTITUD
 Y LINEALIDAD DEL METODO PARA LA SOLU-
 CION NASAL

Cantidad agregada (μg)	Cantidad recuperada (μg)	% Recuperación
8.500	8.434	99.223
8.500	8.228	96.800
8.500	8.485	99.823
8.500	8.535	100.411
8.500	8.485	99.823
8.500	8.302	97.670
10.000	10.101	101.010
10.000	9.949	99.490
10.000	10.000	100.000
10.000	10.304	103.040
10.000	10.000	100.000
10.000	9.810	98.100
11.500	11.414	99.252
11.500	11.823	102.808
11.500	11.515	100.130
11.500	11.465	99.695
11.500	11.218	97.547
11.500	11.414	99.252

CALCULOS PARA LA EVALUACION DE LA PRECISION

Como: $H_0: \sigma \leq 1.5\%$

$H_a: \sigma > 1.5\%$

Con: $n = 18$
 $S = 1.2967$
 $\chi_{\text{Calc.}} = 12.704$
 $\alpha = 0.050$
 $g.l. = 17$

Area de aceptación:

$$7.564 < 12.704 < 30.191$$

Intervalo de confianza:

$$0.9730 < \sigma < 1.9439$$

Por lo tanto el método resulta preciso.

Como: $C.V. \leq 2\%$

Donde: $C.V. = \text{Coeficiente de variación}$

Con: $S_{\% \text{recup.}} = 1.6054$

$\bar{X}_{\% \text{recup.}} = 99.6707$

$C.V. = 1.6107$

Por lo tanto el método es repetible.

CALCULOS PARA LA EVALUACION DE LA EXACTITUD

Como: $H_0 = \bar{X} = 100\%$

$H_a = \bar{X} \neq 100\%$

Con: $\bar{X} = 99.690$

$S = 1.2967$

$t_{Calc.} = -0.796$

$\alpha = 0.050$

$g.l. = 17$

Area de aceptación:

$$-2.1098 < -0.796 < 2.1098$$

Intervalo de confianza:

$$99.69 \pm 0.6448$$

Por lo tanto el método resulta exacto.

CALCULOS PARA LA EVALUACION DE LA LINEALIDAD

- Inferencia para la ordenada al origen (A):

Como:	$H_0: A_0 = 0$		
	$H_a: A_0 \neq 0$		
Con:	$\bar{X} = 10$	$\Sigma X = 180$	$S_{y/x} = 0.1585$
	$S_x = 1.2967$	$\Sigma X^2 = 1827$	$\hat{S}_{y/x} = 0.1631$
	$r = 0.9923$	$\Sigma XY = 1322.39$	$t_{A_0} = 0.7356$
	$B = 1.0211$	$\Sigma Y = 179.482$	$\alpha = 0.0500$
	$A = -0.239$	$\Sigma Y^2 = 1818.24$	$g.l. = 16$

Area de aceptación:

$$-2.12 < 0.7358 < 2.12$$

Intervalo de confianza:

$$-0.239 \pm 0.6911$$

Por lo tanto se acepta H_0 y nuestra ordenada al origen es igual a cero.

- Inferencia para la pendiente (B):

Como:	$H_0: B_0 = 1$
	$H_a: B_0 \neq 1$
Con:	$t_{B_0} = 0.6709$

Area de aceptación:

$$-2.12 < 0.6709 < 2.12$$

Intervalo de confianza:

$$1.0211 \pm 0.0666$$

Por lo tanto se acepta H_0 y nuestra pendiente es igual a uno.

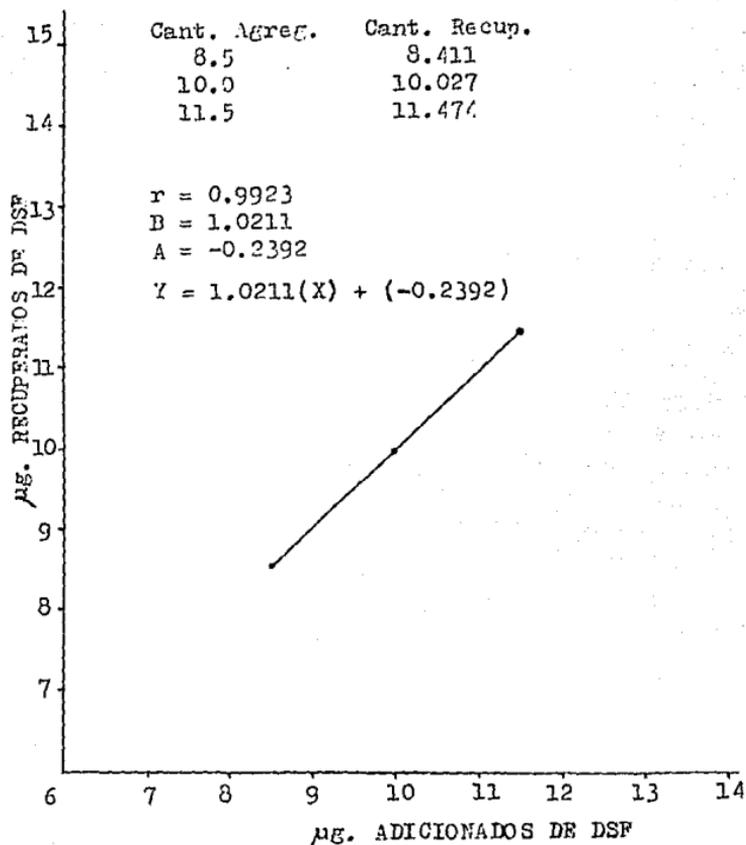


Fig. Nº 12 Gráfica de la linealidad del método para la cuantificación de la dexametasona base en una solución nasal.

TABLA N° IX RESULTADOS DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL
MÉTODO PARA LA SOLUCIÓN NASAL

	Analista 1	Analista 2
Día 1	99.85	99.33
	99.33	100.48
	100.34	99.83
Día 2	100.34	99.31
	99.83	99.83
	99.85	99.85

$$\frac{\sum_{i=1}^a Y_{i..}^2}{br} = 119630.36$$

$$\frac{Y_{...}^2}{abr} = 119630.29$$

$$\frac{\sum_{j=1}^b Y_{.j.}^2}{ar} = 119630.29$$

$$\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij.}^2}{r} = 119630.47$$

$$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r Y_{ijk} = 119632.02$$

TABLA N° X AFADDEVA PARA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO
DE LA SOLUCION NASAL

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal.	Ftab. (0.95)
Analista	1	0.07	0.07	0.63	161.14
Día	1	0.00	0.00	0.00	5.32
Interac- ción ana- lista-día	1	0.11	0.11	0.57	5.32
Error	8	1.55	0.193		

Por lo tanto no existe efecto por analista, efecto por día, ni efecto por interacción analista-día.

11. ANALISIS DE RESULTADOS

11.1 Solución oftálmica.

Al desarrollar los métodos analíticos con azul de tetrazolio (33), y con clorhidrato de fenilhidrazina (16 y 45), se determinó que existen interferencias debidas a los componentes de la formulación, los cuales forman sustancias coloridas que provocan aumento de absorbancias e impiden la cuantificación del principio activo DSF.

Se realizó la especificidad del método por espectrofotometría U.V., y de acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar en la fig. N° 3A que a 241 nm se localizó el pico que corresponde a la DSF, mientras que los picos que se encuentran a 165 nm y 194 nm corresponden al cloruro de benzalconio, esto se confirmó al correr un estándar de este compuesto (fig. N° 3B), por lo que no existen problemas en la determinación de la DSF en la solución oftálmica, ya que el cloruro de benzalconio es el único excipiente de la formulación que presenta absorbancia en la región ultravioleta.

El método resulto específico, ya que al analizar los placebos elaborados, no presentaron respuesta a la longitud de onda de máxima absorción de la sustancia de interés (DSF). El método analítico es capaz de separar la DSF de cualquier interferencia de la formulación debida a sus componentes cuando se cuantifica a 241 nm.

El sistema es lineal: Se realizaron curvas de calibración con el fin de determinar la linealidad, el rango de concentraciones utilizado fue de 6 a 14 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados fueron sometidos a un tratamiento estadístico de inferencias y fueron: $r = 0.9997$; $B = 1.0007$ $A = 0.0400$; esto demuestra que existe una relación lineal entre las distintas concentraciones de DSP, y la respuesta de detección del aparato en el rango de concentraciones antes mencionado.

El método es lineal: Se considera que el método analítico es lineal, ya que presenta un $r = 0.9976$; $B = 1.01$ $A = -0.169$.

El método es preciso y exacto: Se evaluó la precisión mediante una primer prueba con χ^2 con una $\sigma \leq 1.5\%$ y una $\alpha = 0.05$, resultando el método preciso bajo estas condiciones. Para evaluar la repetibilidad del método se utilizó la desviación estándar relativa o coeficiente de variación de los datos del % de recuperación, obteniéndose un valor de 0.9045%, por lo que el método es repetible, tomando como criterio que para un método espectrofotométrico el valor del coeficiente de variación debe ser menor al 2%.

Para la exactitud se recurrió a una prueba de t de student con un $\alpha = 0.05$, resultando el método exacto, puesto que el valor de t de cálculo está dentro de los límites de aceptación.

El método es reproducible: La reproducibilidad se evaluó realizando un análisis de varianza, con dos criterios de clasificación entre analistas y días, habiendo resultado sin diferencias estadísticamente significativas,

ya que: Analista = F cal. < F tab.; Día = F cal. < F tab.
 Interacción analista-día = F cal. < F tab., por lo que el método se considera reproducible.

11.2 Solución nasal.

Al desarrollar los métodos analíticos con azul de tetrazolio (33), y con clorhidrato de fenilhidrazina (16 y 45), se llegó a la misma conclusión que en el caso de la solución oftálmica (ver pág. 64).

Al realizar la especificidad del método por espectrofotometría U.V., se observa que el clorhidrato de fenilefrina y la DSF presentan máximos de absorción muy cercanos (fig. N° 7B y 7C) con una diferencia de 8 nm, lo cual explica que el clorhidrato de fenilefrina interfiera en la cuantificación directa por espectrofotometría U.V. de la DSF, ya que ambos compuestos presentan encimamiento de sus bandas en la misma región del espectro (260-157 nm) alterándose sus máximos de absorción (fig. 1° 7A). Al analizar los espectros de absorción ultravioleta para la DSF y la dexametasona base (fig. N° 8A y 8B), se observa que ambos compuestos presentan el mismo máximo de absorción en concentraciones iguales, aunque en disolventes distintos, esta última característica indica la posibilidad de cuantificar la DSF de manera indirecta en forma de su base libre en cloroformo (Apéndice A y B). Al analizar los espectros de absorción U.V. para las fases acuosas del método por hidrólisis del principio activo DSF en la solución nasal (fig. 1° 9), podemos notar que cuanto mayor es el tiempo

de reflujo utilizando ácido clorhídrico 1N, mayor es la hidrólisis del principio activo DSF, encontrándose de este modo mayor cantidad de su base libre (dexametasona base) en la fase orgánica obtenida en la extracción (fig. N° 10). El método mejoró notablemente al aumentar la concentración del ácido clorhídrico a 5 N, con un tiempo de reflujo de 90 minutos, obteniéndose así un espectro de absorción para la dexametasona base en la fase orgánica igual al de un estándar de dexametasona base en cloroformo de 10 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 8 y 10D), lo cual indica que la totalidad de la DSF fué hidrolizada a dexametasona base (Apéndice A), corroborando esto al observar que en la fase acuosa correspondiente no existe un pico con longitud de máxima absorción a 241 nm (fig. N° 9D).

El método es específico: El método resultó específico ya que es capaz de separar la sustancia de interés en forma de dexametasona base, por medio de una hidrólisis y posterior extracción eliminando así la interferencia de la fenilefrina presente en la formulación.

El sistema es lineal: Se realizaron curvas de calibración con el fin de determinar la linealidad, el rango de concentraciones utilizado fue de 6 a 14 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados fueron sometidos a un tratamiento estadístico de inferencias, y fueron: $r = 0.9988$; $B = 1.0157$; $A = -0.1320$, demostrándose así que existe una relación lineal entre las distintas concentraciones de dexametasona base y la respuesta de detección del aparato en el rango de concentraciones antes mencionado.

El método es lineal: Se considera que el método analítico es lineal, ya que presenta: $r = 0.9923$; $B = 1.0211$; $A = -0.239$.

El método es preciso y exacto: Se evaluó la precisión mediante la prueba de χ^2 , con una $\sigma \leq 1.5\%$ y una $\alpha = 0.05$, resultando el método preciso bajo estas condiciones. Para evaluar la repetibilidad del método se utilizó la desviación estándar relativa o coeficiente de variación de los datos del % de recuperación, obteniéndose un valor del 1.6107%, por lo que el método es repetible tomando como criterio que para un método espectrofotométrico el valor del coeficiente de variación debe ser menor al 2%. Para la exactitud se recurrió a una prueba de t de student con una $\alpha = 0.05$, resultando el método exacto ya que el valor de t de cálculo se encuentra dentro de los límites de aceptación.

El método es reproducible: La reproducibilidad se evaluó realizando un análisis de varianza con dos criterios de clasificación entre analistas y días, habiendo resultado sin diferencias estadísticamente significativas ya que: Analista = $F \text{ cal.} < F \text{ tab.}$; Día = $F \text{ cal.} < F \text{ tab.}$; Interacción analista-día = $F \text{ cal.} < F \text{ tab.}$, por lo que el método se considera reproducible.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

12. CONCLUSIONES

12.1 Solución oftálmica.

El método desarrollado y validado presenta características de sencillez, rapidez y economía, ya que no requirió ni de equipo sofisticado ni de reactivos caros. De los resultados obtenidos se concluye que el método aquí expuesto es lineal en un rango de concentraciones de 6 a 14 $\mu\text{E/ml}$ preciso, exacto, reproducible entre analistas y días y específico para la cuantificación de dexametasona-21-sodiofosfato.

Por lo tanto se propone que este método sea considerado un método analítico de rutina en el departamento de aseguramiento de la calidad, alternativo a los que se proponen en las farmacopeas Nacional y Norteamericana.

El método descrito es útil para el ensayo de producto terminado.

12.2 Solución nasal.

El método desarrollado tiene la característica de transformar a la DSF en su base libre (dexametasona base) la cual se cuantifica espectrofotométricamente. Es específico ya que puede separar el clorhidrato de fenilefrina, el cual era la causa de que métodos reportados para su cuantificación, no pudieran ser aplicados debido a su interferencia.

De los resultados obtenidos se desprende que el método aquí expuesto es lineal en un rango de concentraciones de 8.5 a 11.5 $\mu\text{g/ml}$, así como el sistema es lineal de 6 a 14 $\mu\text{g/ml}$, preciso, exacto y reproducible entre analistas y días y específico para la determinación de DSF en forma de su base libre.

A pesar de que se lleva un tiempo relativamente largo en el análisis, tiene la ventaja de ser económico, ya que no requiere de reactivos costosos ni de equipo sofisticado, como los que se utilizan en los métodos reportados en la bibliografía.

De este modo el método es confiable para ser utilizado como una técnica de rutina en el análisis de producto terminado de una solución nasal, tomando en consideración las características que se citan en este trabajo con respecto a su validación.

BIBLIOGRAFIA

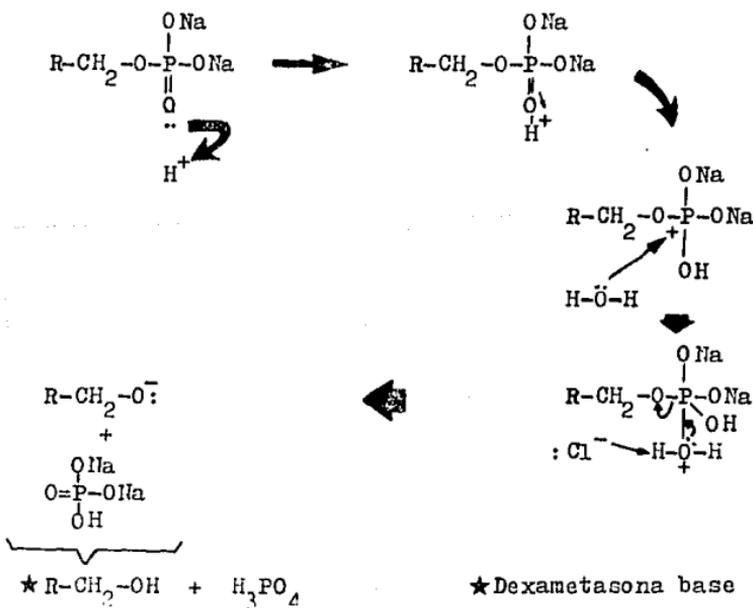
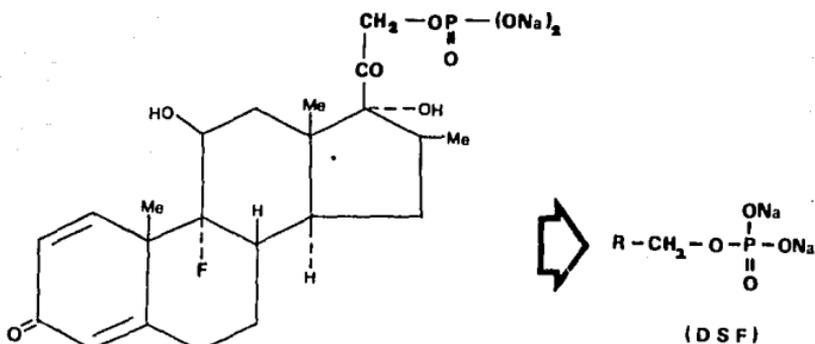
1. Ama Drug Evaluations, fourth edition, American Medical Association, Chicago Illinois, (1980), pp. 642-644.
2. Bowman, W. C., Bases Bioquímicas y Patológicas Aplicaciones Clínicas, Edit. Interamericana, segunda edición, México D.F., (1984), pp. 19.5-19.17.
3. Drill, A., Farmacología Médica, Edit. La Prensa Médica, México D.F., (1978), pp. 457-470.
4. Goodman, L.S. y Gilman, A., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, quinta edición, Edit. Interamericana, México D.F., (1978), pp. 421, 989, 1214 y 1240 1257.
5. Goth, A., Farmacología Médica, Edit. Interamericana México D.F., (1978), pp. 540-547.
6. Rodríguez, C.R., Vademecum de medicamentos, Vol. 1 Dirección General de Publicaciones de la UNAM, México D.F., (1984), pp. 230-231.
7. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, Ediciones PLM No. 33, México D.F., (1978), pp. 197 y 267 - 268.
8. Johnson, R., Estadística Aplicada, Edit. Limusa, México D.F., (1971), pp. 349-358.
9. Ostle, B., Estadística Aplicada, Edit. Limusa, México D.F., (1983), Capítulos 7, 8, 14 y 15.
10. Spiegel, M., Teoría y Problemas de Estadística, Edit. McGraw-Hill, México D.F., (1970), Apéndices II, III.

11. Brown, G., Química Cuantitativa, Edit. Reverte, México D.F., (1967), pp. 522-524.
12. Morrison, R., Química Orgánica, Edit. Fondo Educativo Interamericano, México D.F., (1976), pp. 766-777 1089-1091.
13. Connors, K.A., Curso de Análisis Farmacéutico, Edit. Reverte, México D.F., (1978), pp. 220-225.
14. Dilts, R., Analytical Chemistry, Edit. Van Nostrand Company, New York, (1961), pp. 264-269.
15. Florey, K., Analytical Profiles of Drug Substances Vol. II, Academic Press England, (1979), pp. 180 - 187.
16. Higuchi, T., Pharmaceutical Analysis, Interscience Publishers Inc., New York, (1961), pp. 56-61.
17. Jenkis, R., Quantitative Pharmaceutical Chemistry McGraw-Hill book Co., U.S.A., (1974), pp. 54-64.
18. Clarke, E.G.C., Isolation and Identification of Drugs, Vol. I, The Pharmaceutical Press London (1984), pp. 578.
19. Handbook of Chemistry and Physics, forty-fifth Edition, Published by The Chemical Robber Co., Cleveland Ohio U.S.A., (1964), pp. 34-40.
20. British Pharmacopoeia, Vol. I, Her Majestys Stationary Office University Press, England, (1980), pp. 140-142.
21. The Merck Index, tenth edition, Published by Merck Co. Inc., Rahway, New York, U.S.A., (1983), pp. 425 925 y 1051.

22. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, twenty-seventh edition, London The Pharmaceutical Press, (1972) pp. 36, 515, 519 y 1387.
23. The Pharmaceutical Codex, eleventh edition, London The Pharmaceutical Press, (1979), pp. 291-294.
24. The United States Pharmacopoeia, nine-tenth, Revision Official From July 1, (1975), pp. 364.
25. The United States Pharmacopoeia, twenty-first, Revision Official from January 1, (1985), pp. 291-294.
26. Farmacopoea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4a edición, México D.F., (1974).
27. Roguez, A., Espectroscopía visible y ultravioleta (seminario), Asociación Farmacéutica Mexicana (1981).
28. Schults, E.P., and Diaz M.A., "Colorimetric assay of 4,6-unsaturated-3-ketosteroids using sodium picrate reagent", J. Pharm. Sci. 53, 115-117, (1964)
29. Levine, J., and Doyle, T., "Determination of phenylephrine in combinations with other drugs" J. Pharm. Sci. 56, (5), 619-622, (1967).
30. Montgomery, K.O., and Jennings, P.V., "Analysis of combinations containing phenylephrine in liquid dosage forms", J. Pharm. Sci. 56, (3), 393-395 (1967).
31. Gorog, S., "Analysis of steroids VIII", J. Pharm. Sci. 57, (10), 1737-1741, (1968).
32. Ponder, C., "Determination of phenylephrine hydrochloride in combination with other drugs" J. Pharm. Sci. 57, (3), 467-469, (1968).

33. Grahan, R., and Kenner T., "Rapid blue tetrazolium procedure for analysis of corticosteroids in pharmaceutical preparations", J. Pharm. Sci. 67, (6) 792-795, (1978).
34. Robertson, G., "Analysis of steroids phosphates by high pressure liquid chromatography", J. Pharm. Sci. 67, 913-915, (1978).
35. Gupta, V., "Quantitative dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate by high pressure liquid chromatography", J. Pharm. Sci. 68, (7), 926-928
36. Guerra, J., "Validation of analytical methods by FDA laboratories", J. Pharm. Tech. 10, (3), 74-77 (1986).
37. Finkelson, M., "Validation of analytical methods" J. Pharm. Tech. 10, (3), 75-79, (1986).
38. Taylor, J., "Validation of analytical methods" Anal. Chem. 55, (6), 601A - 608A, (1983).
39. Vanderwielen, J., and Hardwidge, E., "Guidelines for assay validation", J. Pharm. Tech. 7, (4) 45-49 (1982).
40. Lyttle, D.A., "Titrate enzymatic of corticosteroids sodium phosphate", Chem. Abstr. 65, 571 h (1966).
41. Kawanabe, S., "Isolation of 3-hydroxycorticosteroids sodium phosphates and 3-oxoosteroids", Chem. Abstr. 87, 4592 c, (1976).
42. Bundgaard, H., "Assay spectrophotometric in stability of dexamethasone", Chem. Abstr. 89, 95049 x (1978).

43. Loo, J.C.K., "Separation hormones steroidal of chromatography layer fine of phase inverted" Chem. Abstr. 96, 223376 k, (1982).
44. Ridjerd, A., "Determination of polarimetry", Chem. Abstr. 96, 16116 g, (1982).
45. Zagazig, R., "Determination colorimetric of corticosteroids", Chem. Abstr. 102, 119746 n, (1985).
46. Zakhari, N., "Determination spectrofotometric of corticosteroids", Chem. Abstr. 102, 191227 m (1985).
47. Hyat, R.J., "The use of charge transfer compleja-tion in the spectrofotometric determination of so me corticosteroids drugs through intermediate oxi me formation", Chem. Abstr. 105, 120900 b, (1986)
48. Witman, K., "Determination of by spectrophotome-try of charge transfer complexes with iodine or chloranyl", Chem. Abstr. 105, 120900 b (1986).
49. Pitstick, G., "Determination of dexamethasone den sitometer", Chem. Abstr. 106, 11984 d, (1987).
50. Priatz, J., "Determination of dexamethasone in pharmaceutical by diferential pulsed polarogra-phy", Chem. Abstr. 105, 139736 z, (1986).

APENDICE AReacción de hidrólisis ácida para la DSF

APENDICE BEstudio para la extracción de la base libre dexametasona
base

Para poder cuantificar el principio activo DSP en forma de base libre es necesario realizar una serie de extracciones posteriores a la hidrólisis con el disolvente apropiado, para lo cual se realizó el siguiente estudio:

- Solubilidad de la dexametasona base en cloroformo = 0.009 g/ml.
- Solubilidad de la dexametasona base en agua = 0.0001 g/ml.
- Coeficiente de reparto (cloroformo-agua) para la dexametasona base:

$$D = A_{(p2)} / A_{(p1)}$$

Donde: D = Coeficiente de reparto

$A_{(p2)}$ = Solubilidad de la dexametasona base en la fase orgánica cloroformo.

$A_{(p1)}$ = Solubilidad de la dexametasona base en la fase acuosa agua.

por lo que:

$$D = \frac{0.0090 \text{ g/ml}}{0.0001 \text{ g/ml}} = 90 = \text{Coeficiente de reparto}$$

En el caso de la dexametasona base, el coeficiente de reparto (cloroformo-agua) es de un valor elevado, lo cual nos indica que resulta menor la cantidad de dexametasona base que queda en la fase acuosa después de una extracción. Si se separa la fase orgánica de la primera extracción tenemos que:

$$W_n = W_0 \left(\frac{V_2}{DV_1 + V_2} \right)^n$$

Donde: n = número de extracciones.

W_n = Cantidad de dexametasona base que queda en la fase acuosa después de "n" extracciones.

W_0 = Cantidad inicial de dexametasona base en la fase acuosa.

V_1 = Volúmen de la fase acuosa.

V_2 = Volúmen de la fase orgánica utilizada en la extracción (cloroformo).

D = Coeficiente de reparto.

$$\begin{aligned} W_1 &= 1 \text{ mg } (20 \text{ ml} / (90 \times 20 \text{ ml}) + 20 \text{ ml})^1 \\ &= 10.989 \times 10^{-3} \\ &= 1.099\% \end{aligned}$$

... y si se utiliza otra extracción de la misma fase acuosa tenemos que:

$$\begin{aligned} W_2 &= 1 \text{ mg } (20 \text{ ml} / (90 \times 20 \text{ ml}) + 20 \text{ ml})^2 \\ &= 12.075 \times 10^{-5} \\ &= 0.012\% \end{aligned}$$

... y en una tercera extracción:

$$\begin{aligned}W_3 &= 1 \text{ mg } (20 \text{ ml} / (90 \times 20 \text{ ml}) + 20 \text{ ml})^3 \\ &= 13.270 \times 10^{-7} \\ &= 0.00013\%\end{aligned}$$

Por lo que con tres extracciones de la fase acuosa con 20 ml de cloroformo cada una, se garantiza una extracción completa de la dexametasona base, quedando si acaso, un 0.00013% de éste compuesto en la fase acuosa.

APENDICE CExactitud

Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ de student}$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{\bar{X} - 100}{S / \sqrt{n}}$$

Donde: \bar{X} = Media

S = Desviación estándar

n = Número de datos

Area de aceptación:

$$-t_{1-\alpha/2} < t_{\text{calc.}} < t_{1-\alpha/2}$$

Intervalo de confianza:

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

Precisión

Estadígrafo de contraste:

χ cuadrada

$$\chi_{\text{calc.}} = \frac{(n-1)(S^2)}{\sigma^2}$$

Donde: n = Número de datos

S = Desviación estándar

σ = Desviación estándar poblacional

Area de aceptación:

$$\chi_{\alpha/2} < \chi_{\text{calc.}} < \chi_{1-\alpha/2}$$

Intervalo de confianza:

$$\sqrt{\frac{(n-1) S^2}{X_{\text{tab. } 1-\alpha/2}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1) S^2}{X_{\text{tab. } \alpha/2}}}$$

Linealidad

Ecuación de la recta:

$$Y = A + BX$$

Donde: A = Ordenada al origen

B = Pendiente

Y = Cantidad recuperada

X = Cantidad agregada

Ecuaciones para calcular la ordenada al origen y la pendiente por mínimos cuadrados:

$$A = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$B = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

Inferencias para calcular la ordenada al origen (A):

$$t_{\text{calc.}} = \frac{A - A_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - A(\sum Y) - B(\sum XY)}{n}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = (S_{y/x}) (\sqrt{n/n-2})$$

Donde: A = Ordenada al origen experimental

n = Número de datos

$\hat{S}_{y/x}$ = Error típico modificado

$S_{y/x}$ = Error típico

Area de aceptación:

$$-t_{1-\alpha/2} < t_{\text{calc.}} < t_{1-\alpha/2}$$

Intervalo de confianza:

$$A_{\text{calc.}} \pm (t_{1-\alpha/2}) (\hat{S}_{y/x}) \left[\sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}} \right]$$

Inferencias para calcular la pendiente (B):

$$t_{Bo} = \frac{(B - B_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

Donde: B = Pendiente experimental

S_x = Desviación estándar de x

n = Número de datos

Area de aceptación:

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

Intervalo de confianza:

$$B_{\text{calc.}} \pm (t_{1-\alpha/2}) \left[\frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} \right]$$

$$C.V. = \frac{S_{\text{recup.}\%}}{X_{\text{recup.}\%}} \times 100$$

Donde: C.V. = Coeficiente de variación (repetibilidad)

$S_{\text{recup.}\%}$ = Desviación estándar del porcentaje de recuperación

$X_{\text{recup.}\%}$ = Media del porcentaje de recuperación

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

$$\text{C.R.} = \frac{\text{Abs. M}}{\text{Abs. S}} \times \text{P.S.}$$

Donde: C.R. = Cantidad recuperada
Abs. M = Absorbancia de la muestra
Abs. S = Absorbancia del estándar
P.S. = Peso del estándar

Peso molecular de la dexametasona-21-sodio-fosfato =
516.41

Peso molecular de la dexametasona fosfato =
472.45

Peso molecular de la dexametasona base =
392.50

TABLA DE ANADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cálculo
Ai (filas)	(a-1) (i-1)	$\frac{\sum Y_i^2}{bc} - \frac{Y^2}{abc}$	$\frac{SC A}{(i-1)}$	$\frac{MC A}{MC AD_{ij}}$
Dj (columnas)	(b-1) (j-1)	$\frac{\sum Y_j^2}{ac} - \frac{Y^2}{abc}$	$\frac{SC D}{(j-1)}$	$\frac{MC D}{MC AD_{ij}}$
ADij (interac.)	(a-1)(b-1) (i-1)(j-1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{c} - \frac{\sum Y_i^2}{bc} - \frac{\sum Y_j^2}{ac} + \frac{Y^2}{abc}$	$\frac{SC AD}{(i-1)(j-1)}$	$\frac{MC AD}{MC Error}$
Bijk (Error)	(a·b)(c-1) (i·l)(k-1)	$\sum Y_{ijk} - \frac{\sum Y_{ijk}^2}{c}$	$\frac{SC E}{i \cdot j (k-1)}$	_____

Inferencias (F):

- I.- Analista: Si $F_{calc. A} < F_{0.95}$ No existe efecto debido al analista
- II.- Día: Si $F_{calc. D} < F_{0.95}$ No existe efecto debido al día
- III.- Interac.: Si $F_{calc. AD} < F_{0.95}$ No existe efecto debido a la interacción analista-día