

17  
2ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

PROYECTO: VALIDACION DE DOS  
METODOS ANALITICOS PARA LA  
CUANTIFICACION DE NORETINDRONA  
ETINIL ESTRADIOL EN PRODUCTO  
TERMINADO. (CROMATOGRAFIA DE  
GASES Y CROMATOGRAFIA DE  
LIQUIDOS DE ALTA PRESION).

TESIS CON  
FALIA DE CRIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
L U I S D U R A N M O R E N O

ASESORES:

Q.F.B. RAQUEL BASILIO GARCIA  
Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES



MEXICO, D. F.

1 9 9 2



## **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.

1.	INTRODUCCION	1
2.	FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
2.1	Monografia de Noretindrona	5
2.1.1	Propiedades Quimicas y Fisicas	6
2.1.2	Actividad farmacológica	6
2.2	Monografia de Etinil Estradiol	7
2.2.1	Propiedades Quimicas y Fisicas	7
2.2.2	Actividad farmacológica	8
2.2.3	Actividad farmacológica como mezcla	8
2.3	CROMATOGRAFIA	14
2.3.1	Cromatografia de adsorción	15
2.3.2	Cromatografia de Partición	15
	A. Cromatografia de Fase Normal	
	B. Cromatografia de Fases Inversa	
2.3.3	Cromatografia de Exclusión	16
2.3.4	Cromatografia de Intercambio Ionico	16
2.4	DEFINICIONES EN CROMATOGRAFIA	17
2.5	CROMATOGRAFIA DE GASES	22
2.6	CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION (CLAR ).	25

2.7	VALIDACION	30
3	PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1	PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	37
3.2	OBJETIVOS	38
3.3	HIPOTESIS	39
3.4	REACTIVOS Y EQUIPO	40
3.5	METODOLOGIA	43
3.6	VALIDACION ESTADISTICA DEL METODO	45
3.6.1	Diseño Experimental para Evaluar cada parámetro estadístico	45
3.6.2	Diseño Experimental para Evaluar la comparación de los métodos Analítico.	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Especificidad frente a excipientes.	49
4.2	Linealidad para Noretindrona	52
4.2.1	Linealidad del método C.Gases en la cuantificación de noretindrona	52
4.2.2	Linealidad del método CLAR en la cuantificación de noretindrona	58
4.2.3	Comparación estadística de los dos métodos de cuantificación de noretindrona por la linealidad a través de la pendiente	63

4.3	Linealidad para Etilil Estradiol	65
4.3.1	Linealidad del método C.Gases en la cuantificación de Etilil estradiol	65
4.3.2	Linealidad del método CLAR en la cuantificación de Etilil estradiol	70
4.3.3	Comparación Estadística de los dos métodos de cuantificación de etinil estradiol por la linealidad a través de la pendiente.	75
4.4	Precisión para Noretindrona.	76
4.4.1	Precisión de Noretindrona por C.Gases	76
4.4.2	Precisión de Noretindrona por CLAR.	79
4.4.3	Comparación Estadística de los dos métodos de cuantificación de Noretindrona	81
4.5	Precisión para Etilil estradiol.	83
4.5.1	Precisión de Etilil estradiol por C.Gases	83
4.5.2	Precisión de Etilil estradiol por CLAR.	86
4.5.3	Comparación estadística de los dos métodos de cuantificación de Etilil Estradiol.	89
4.6	Exactitud	91
4.6.1	Exactitud de Noretindrona y Etilil estradiol por C.Gases.	91

4.6.2	Exactitud de Noretindrona y Etilnil estradiol por CLAR.	95
4.6.3	Comparación Estadística de los dos métodos de cuantificación de Noretindrona y etinil estradiol .	99

	Tablas comparativas de resultados generales en la cuantificación de noretindrona y etinil estradiol por CLAR y C.Gases.	104
--	---	-----

5.	DISCUSION DE RESULTADOS	112
----	-------------------------	-----

6.	CONCLUSIONES	115
----	--------------	-----

	BIBLIOGRAFIA	116
--	--------------	-----

	ANEXO	
--	-------	--

## INTRODUCCION

El empleo de mezclas hormonales como anticonceptivos en los últimos años ha aumentado; debido al uso de la dosificación de menores cantidades de estrógenos como de progestágenos en la formulación. El interés fundamental radica en tratar de obtener una medicación balanceada que ofrezca alta seguridad como anticonceptivo y la reducción de los posibles efectos secundarios.

Lo anterior, plantea una gran responsabilidad al campo del análisis farmacéutico. Ya que la calidad de los medicamentos fabricados debe ser adecuada y eficaz en cuanto su acción terapéutica, con ello asegurar que el producto está de acuerdo al diseño terapéutico establecido.

Sin embargo, con la ayuda de las técnicas analíticas actuales. podemos llegar a resolverlos.

Una de las técnicas más utilizadas en la actualidad es la cromatografía. La cromatografía, es un método de separación, que por sí mismo, no permite, la identificación, ni la medición cuantitativa. La expresión, algo vaga, pero práctica " Métodos Cromatográficos de Análisis " corresponde en realidad a una combinación de la cromatografía con los métodos apropiados de detección. (17)

La cromatografía esta clasificada de acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación. Una de ellas es la cromatografía en columna, la fase móvil puede ser un líquido o un gas, según el caso se denominaran respectivamente: " Cromatografía Líquida " y " Cromatografía de Gases ". La separación de los componentes de una mezcla por estos métodos, se basan; En una fase móvil que fluye a lo largo del relleno de la columna, arrastrando los componentes de la muestra, que son selectivamente retenidos por la fase estacionaria que se mantiene constante a través de todo el proceso y de esta manera se logra que cada componente sea eluido de la columna como un compuesto puro, disuelto en la fase móvil (18)

El presente trabajo describe el uso de dos técnicas cromatograficas de análisis, la Cromatografía de Gases y la Cromatografía de Líquidos a Alta Presión, para la cuantificación de un producto para el control farmacológico de la reproducción, que contiene en su formulación Noretindrona - Etilnil Estradiol.

Los métodos propuestos para la cuantificación de este producto fueron modificados, de tal forma que se tuviera la máxima resolución entre los principios activos de la formulación, para su adecuada cuantificación, posteriormente se aplicó el estudio estadístico para la validación de los métodos analíticos y con ello cumplir con los lineamientos de la Ley General de Salud, en que todos los métodos analíticos deben validarse para poder asegurar que los resultados son confiables al momento de tener el producto final con la calidad requerida para el consumo humano.

Al termino del presente trabajo se describe la validación de los dos métodos analíticos. En donde los dos cumplen con los requerimientos mínimos de la validación para métodos analíticos de control de calidad y así como a través de la evaluación estadística se puede comprobar que los métodos son equiparables entre si.

## **2. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA**

En la actualidad, se han puesto a la venta dos clases reconocidas de anticonceptivos; una combinación de estrógeno-progestageno y una minipildora de progestógeno solo.

La tableta con la combinación. contiene un compuesto estrogénico sintético ( etinil estradiol o mestranol ) y un progestógeno sintético ( deacetato de etinodiol, noretindrona, acetato de noretindrona y norgestrel ). Se toma durante 21 días del ciclo menstrual ( por lo general del quinto día al vigésimo cuarto día ). Los esteroides naturales no se emplean debido a que se requieren dosis grandes para alcanzar el mismo efecto farmacológico de los sintéticos.

La minipildora con progestageno únicamente contiene noretindrona o norgestrel, y se toma una vez al día durante todos los días del ciclo menstrual.

Los estrógenos, suprimen la ovulación al inhibir la liberación de las hormonas de la hipófisis disparadoras de la ovulación. La ingestión más prolongada de progestágenos produce cambios en el moco cervical, altera el transporte tubárico del óvulo y hace que el endometrio sea menos propicio para la implantación del blastocisto.

Los anticonceptivos orales inhiben la ovulación por un mecanismo de retroalimentación negativa dirigida al hipotálamo. Y pueden evitar el transporte del óvulo a través de las trompas de falopio. ( 1,2 )

En la actualidad, la forma de cuantificación de estos principios activos, son volumétricos, como por cromatografía de líquidos y de gases. ( 4,5 )

## 2.1 MONOGRAFIA DE NORETINDRONA.

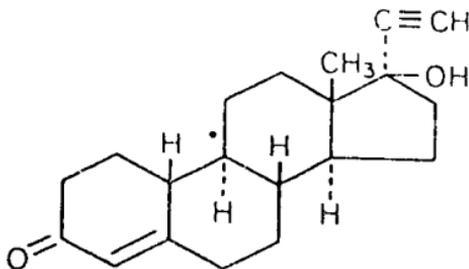
### 2.1.1 Propiedades Químicas y Físicas

NOMBRES QUIMICOS: 17- hidroxil-17 alfa-pregna-4-on - 20 in-3-ona; 17- hidroxil-19-norpregnona- 4- 20 - iona 3; 19-norpregnona 4- on -20 -in-3-ona; 17 - alfa etinil - 19-nortestosterona.

FORMULA CONDENSADA Y DESARROLLADA

Fórmula condensada : C H O  
20 26 2

Fórmula desarrollada.

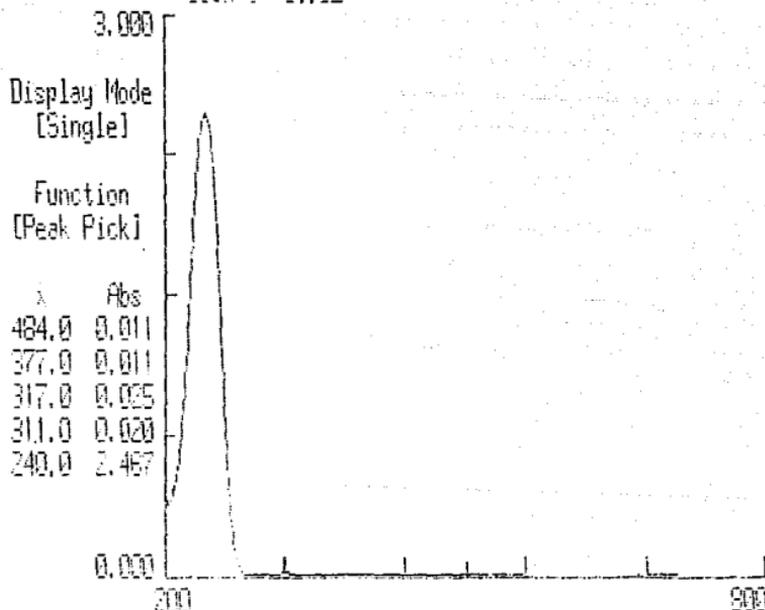


DESCRIPCION: Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo, inodoro.

PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICAS. Punto de fusión: 202-208 C. Rotación Óptica: Entre -30 y -38 determinada en una solución que contenga 200 mg de la muestra en 10 ml de Dioxano; la solución resultante es transparente y libre de sólidos sin disolver. En cloroformo en una solución con concentración de 10 mg/ml la rotación es de -23 a -27 . Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, soluble 1 en 150 partes en metanol ( 750 g/ l ), en 80 partes de acetona, en 30 partes de cloroformo y en 5 partes de piridina (3,4,5)

### 2.1.2 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA

Produce efectos progestionales semejantes a los de la progesterona. Impide el embarazo por varios mecanismos: inhibe la ovulación al inhibir la secreción de gonadotrofinas, aumenta la viscosidad de la secreción endocervical, impidiendo la penetración de los espermatozoides a la cavidad uterina, produce atrofia del endometrio e impide la nidación. Su biotransformación y excreción se efectúan principalmente en el hígado y riñón respectivamente. ( 6 )



**GRAFICA No.1.** Aquí se observa el espectro de noretindrona, desde 200 a 800 nm ( espectro UV y Visible ); donde se a precian sus puntos de máximos absorvancia.

## 2.2 MONOGRAFIA DE ETINIL ESTRADIOL

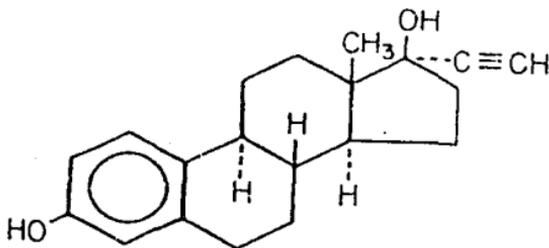
## 2.2.1 PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICAS

NOMBRES QUIMICOS . 19 - Nor - 17 alfa - pregna - 1,3,5 ( 10 ) - trien - 20 - ino - 3 , 17, diol; 17 etinil - estra - 1,3,5, ( 10 ) - trieno - 3, 17 beta - diol.

## FORMULA CONDENSADA Y DESARROLLADA.

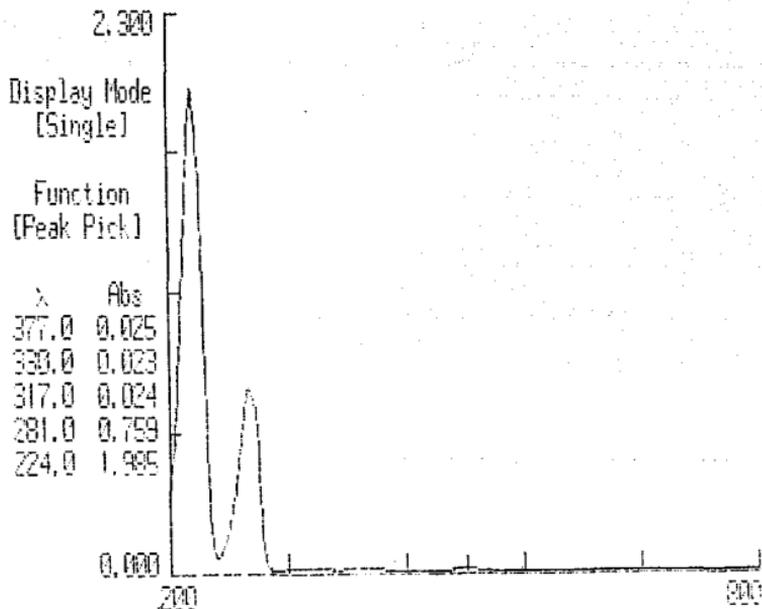
Fórmula condensada: C H O  
20 24 2

Fórmula desarrollada:



Descripción: Polvo blanco ó amarillo claro, cristalino, inodoro.

Propiedades Químicas y Físicas. Punto de fusión. puede existir de dos formas polimórficas, una de las cuales funde a 183 C y la otra metaestable a unos 143 C (141-146 C). Rotación Óptica. Entre -27 y -30 determinado en una solución de piridina que contenga 40mg de la muestra en cada 10 ml ó de 3.15 + 0.5 en una solución de dioxano. Absorción al espectro con luz Ultravioleta en etanol, se observa un máximo cerca de los 280 nm; en una solución 1% de ácido clorhídrico -metanol el máximo a 251, en 1 N de hidróxido de potasio -metanol máximo a 298 nm. (3,4,5)



**GRAFICA No.2.** Aquí se observa, el espectro de etinil estradiol, desde 200 a 800 nm (espectro UV y visible), donde se aprecian sus máximos de absorvancia.

### 2.2.2 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA

Se absorbe rápidamente y casi por completo en el tracto gastrointestinal, donde se establece un circuito enterohepático; se liga a globulina, albúmina y se fija al músculo uterino, atraviesa la barrera placentaria. Es excretado en la orina en forma de glucuronato en un 10 a 20 % y en un 50 % por la bilis.

El etinil estradiol es el más activo de los estrógenos esteroides conocidos. 0.5 mg son suficientes para suprimir la ovulación con un mínimo de reacciones adversas. Su vida media es de 6 a 10 hrs. Comparte con el estradiol la capacidad de inducir y mantener los cambios que operan en la pubertad de las niñas y de condicionar, presumiblemente, el comportamiento femenino. En los tejidos que responden a los estrógenos se han detectado receptores proteínicos citoplasmáticos con los cuales se fijan para luego pasar al núcleo celular donde promueven la lectura del ADN en sitios previamente inhibidos. ( 6 )

### 2.3 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA COMO MEZCLA

Las formulaciones que contienen estos principios activos. Tienen efectos estrogénicos y progestánicos por su contenido en estradiol y noretindrona, respectivamente. La noretindrona tiene un débil efecto androgénico. Esta mezcla inhibe la secreción hipofisiaria de hormonas foliculo-estimulantes y luteinizante y suprime la ovulación; modifica el moco cervical haciendolo viscoso e impenetrable a los espermatozoides; altera el transporte tubario y la nidación. El efecto combinado de estas acciones determina su gran eficiencia en la prevención del embarazo ( 99.9% de eficacia teórica y 97.5% de eficacia de uso ).

El endometrio que se ha vuelto secretor bajo los efectos estrogenicos y progestinicos, produce sangrado menstrual cuando disminuye bruscamente estos efectos. Tiene un doble efecto anti-androgénico indirecto: al inhibir la secreción de andrógenos ováricos, inhibe la 5-alfa-reductasa, enzima de los tejidos andrógeno-sensibles que convierte a los andrógenos inactivos ( testosterona ) en androgenos activos (dihidrotestosterona). ( 6 )

En estudios clinicos( 7,8,9,10,11,12,13 ). realizados, no se presentaron embarazos, advirtiendose discretas modificaciones en la calidad del sangrado clínico , como la disminución de la calidad y duración del mismo.

Los efectos secundarios observados en los estudios, solo el 4.5 % del total de 1,320 ciclos menstruales se presento náusea y el 0.9 % vómito.

Las variaciones de peso corporal fueron interesantes, ya que en el 43.4 % de las pacientes hubo baja, mientras en 40.6 %, aumento, en ambos casos las cifras fueron moderadas.( 7,8,9,10,11,12,13 )

Acontinuación se presentan unos cuadros de resultados obtenidos por el Dr. E.M. MORIGI, donde se podrá observar los efectos secundarios anteriores descritos pero de una forma más esquematizada.(9)

-----  
 TABLA I. COMPARACION DE FLUJO MENSTRUAL DURANTE  
 EL CICLO DE ESTUDIO  
 -----

FLUJO MENSTRUAL	No. de ciclos	% total
Disminución	8626	52.8
Sin cambio	4176	25.5
Aumento	1989	12.2
No Evaluable	1554	9.5

-----

TABLA I. Como podemos observar en la presente tabla los efectos de la dosificación con respecto al flujo menstrual, hay una pequeña disminución. ( 9 )

-----  
 TABLA II. DURACION DE LOS CICLOS MENSTRUALES  
 DURANTE LA TERAPIA  
 -----

Duración ( días )	No. de Pacientes	%
19 ó menos	11	0.9
20	1	0.1
21	5	0.4
22	4	0.3
23	14	0.3
24	22	1.2
25	55	1.8
26	114	4.5
27	287	9.4
28	349	23.6
29	158	13.0
30	69	5.7
31	55	4.5
32	27	2.2
33	9	0.7
34	7	0.6
35	7	0.6
36	4	0.3
37	5	0.4
38 ó más	12	1.0
-----		-----
TOTAL	1215	100.0
-----		-----

Tabla II. La duración del ciclo menstrual, no se afecta significativamente por el uso del medicamento debido que el periodo normal de duración es de 26 a 29 días aproximadamente.(9)

-----  
 TABLA III. PRESENTACION DE DISMENORREA Y TENSION  
 PREMENSTRUAL DURANTE LA TERAPIA. EN RELACION CON  
 LA HISTORIA CLINICA PREVIA.  
 -----

	Dismenorrea		Tensión premenstrual	
	No de ciclos		No. de ciclos	
	No.	%	No.	%
Disminución	530	40.2	100	7.6
Sin cambios	741	56.1	1175	89.0
Aumento	14	1.1	10	0.8
No evaluable	35	2.7	35	2.7
-----				
TOTAL	1320	100.0	1320	100.0
-----				

Tabla III. En los problemas de dismenorrea y tensión premenstrual, se observo una disminución significativa durante la medicación de fármaco; en comparación a la historia clinica.( 9 )

-----  
 TABLA IV. SINTOMAS GASTROINTESTINALES.  
 -----

	Número de pacientes	%	Número de ciclos	%	Ciclo más frecuente
Nauseas	40	21.4	59	4.5	1o.
Vómitos	7	3.7	12	0.9	3o.

-----

Tabla VI. Durante todo el estudio clínico, se presentaron problemas de nauseas y vómitos, principalmente en los primeros ciclos .( 9 )

## 2.4 CROMATOGRAFIA

La cromatografía es un proceso de migración diferencial, en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación se dividen en:  
( 4 )

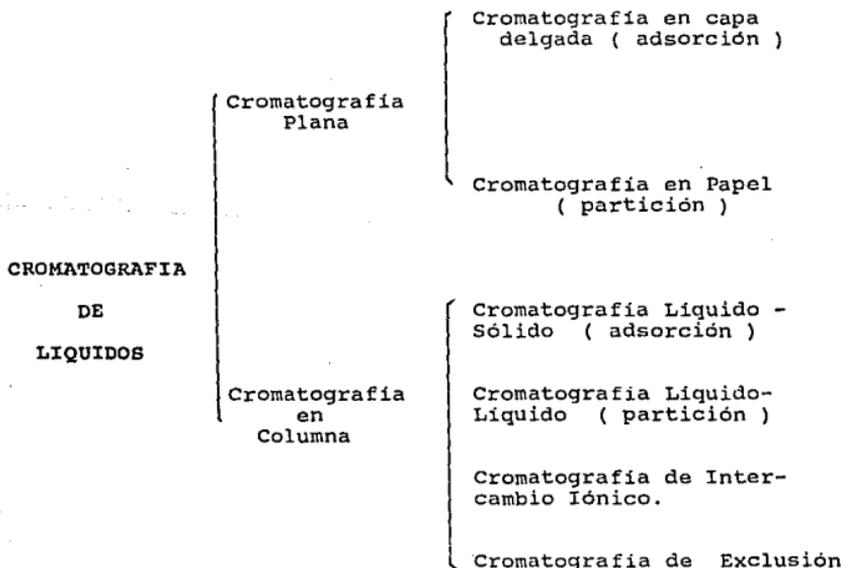


Tabla VII. Clasificación de cromatografía de líquidos de acuerdo a la naturaleza de las fases. (4)

**CROMATOGRAFIA  
DE  
GASES**

Cromatografía Gas- Líquido

( Partición )

Cromatografía Gas - Sólido

( Adsorción )

Tabla VIII. Clasificación de Cromatografía de Gases de acuerdo a las fases involucradas. ( 4 )

Otra clasificación, tomando en cuenta la combinación de los estados físicos de las fases han dado origen a los cuatro tipos fundamentales de la cromatografía.

**2.4.1 CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.** La separación se basa en un fenómeno de adsorción - desorción. cuando la fase estacionaria es un material sólido altamente polar en el cual el soluto se adsorbe en diferentes grados.

Combinando una fase estacionaria sólida con una fase móvil líquida o gaseosa se obtiene la Cromatografía Líquido - Sólido y Cromatografía gas-sólido respectivamente. (14,15)

**2.4.2 CROMATOGRAFIA DE PARTICION.** Si la fase estacionaria es un líquido que recubre un sólido inerte (soporte). Con una fase móvil líquida o gaseosa se obtiene la cromatografía líquido-líquido y la cromatografía gas-líquido.

Está cromatografía a su vez puede clasificarse en cromatografía fase normal o en fase inversa.

**A. Cromatografía fase normal.** Aquí el lecho estacionario es fuertemente polar, de esta forma las muestras polares son fuertemente retenidas en la columna.

**B. Cromatografía fase inversa.** El lecho estacionario es de naturaleza no polar , de esta forma las muestras no polares son fuertemente retenidas en la columna.( 13,14 )

#### 2.4.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION O PERMEACION EN

**GEL.** Cuando se usa como fase estacionaria un material sólido poroso y una fase móvil líquida, se tienen las bases para la separaciones basadas en el tamaño molecular de los solutos. Esto es que la columna contiene un material poroso de diversas dimensiones, que retiene las moléculas de soluto de acuerdo a su tamaño molecular. Se emplea en la determinación de pesos moleculares principalmente.  
(13,14 )

#### 2.4.5 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente (anionica o catiónica ), empleada para compuestos que se presentan cargadas en su estructura química. En este tipo de columnas la fase móvil que generalmente se emplea, es una solución buffer en que el pH y la polaridad se usan para controlar el tipo de elución. ( 13,14 )

## 2.5. DEFINICIONES.

( 14,15,16,17 )

Dentro de la cromatografía se manejan algunos términos y símbolos característicos, para ejemplificarlos a continuación se presenta un cromatograma típico. ( Figura 1 )

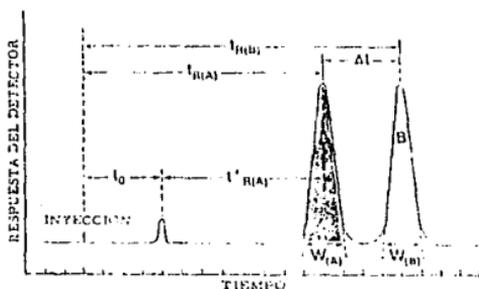


Figura 1. En el cromatograma típico se puede observar; (TR), ES el tiempo de retención, ( W ) es la amplitud del pico , ( h ) es la altura del pico, ( To ) es el tiempo muerto.

**TIEMPO DE RETENCION ( TR ).** Es el tiempo en el cual aparece el máximo de un pico en un cromatograma y está en función de la velocidad de flujo y del volúmen de la fase móvil.

**TIEMPO DE RETENCION MUERTO ( To ).** Es el tiempo que se necesita para eluir un compuesto, que no es retenido por la fase estacionaria.

**TIEMPO DE RETENCION REDUCIDO ( TR' ).** Es el tiempo de retención menos To. Este es el tiempo que el compuesto permanece en la fase estacionaria.

$$TR' = TR - To.$$

RESOLUCION ( R ). Esta determinada por dos factores delta t y W. delta t, es medida de la separación de los máximos de dos picos y puede incrementarse ya sea reduciendo la temperatura ó escogiendo una fase líquida más selectiva. ( mayor ) y W es la anchura del pico.

$$R = \frac{\Delta t}{1/2 ( W_1 + W_2 )}$$

Si R es 1 a 1.5 se resuelven los dos picos de igual área en un 95% ó 99.7 % respectivamente.

SELECTIVIDAD (  $\alpha$  ). Es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase estacionaria.

En la fase estacionaria se realiza la separación y de acuerdo a la interacción que haya con un compuesto y otro se realizara una selección de que pico sale primero y cual al final. Si el valor de  $\alpha = 1$  los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realizara la separación, así mientras más elevados sean los valores de  $\alpha$ , mayor la selectividad de la fase estacionaria y más fácil la separación.

$$= \frac{TR' ( B )}{TR' ( A )} = \frac{TR ( B ) - T_0}{TR ( A ) - T_0}$$

En cromatografía de gases se aumenta la selectividad variando el empaque de la columna, y/o tamaño de partícula del soporte.

En cromatografía de líquidos, se puede mejorar la selectividad por:

- i ) cambio de fase móvil ( aumentando la polaridad, pH y/o la fuerza iónica.
- ii ) Cambio de fase estacionaria, cambio de columna ó variación del tamaño de partícula.
- iii) Variación de temperatura. Puede cambiarse la selectividad aumentando o disminuyendo la temperatura, utilizando un horno para columnas o una circulación de agua.

NUMERO DE PLATOS TEORICOS ( N ). El número de platos teóricos mide la eficiencia de la columna y se puede expresar como:

$$N = \left[ \frac{TR}{W} \right]^2 \times 16$$

DONDE: TR = Tiempo de retención del compuesto

N = Número de platos teóricos

W = Ancho de la base del pico del compuesto

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria y los factores que la afectan; el tiempo de retención, la longitud de la columna, el compuesto, el flujo, el tamaño de la muestra, la técnica de inyección y las características de la columna.

**ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO ( AEPT ).** AEPT Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra, entre la fase móvil y la fase estacionaria, si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos por unidad y por lo tanto, la columna sera más eficiente.

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

DONDE:

AEPT = Altura Equivalente a un Plato Teórico

L = Longitud de la columna expresada en mm ó cm

N = Número de Platos teóricos

Se puede lograr una columna más eficiente. empleando columnas cuya fase esté empacada de manera uniforme y compacta, empleando partículas pequeña ( por ejemplo de 5 a 10 mcm de diámetro en HPLC y de 120/100 de malla en gases ).

**FACTOR DE CAPACIDAD ( k ).** El factor de capacidad es el coeficiente de reparto común a todos los procedimientos de distribución:

$$K = \frac{\text{conc. de la muestra en la fase estacionaria}}{\text{conc. de la muestra en la fase móvil}}$$

Anteriormente se utilizaba el símbolo  $K'$  para mencionar el término factor de capacidad pero en la actualidad las nomenclaturas unificadas establecen el símbolo de  $K$ .

En cromatografía de gases  $K$  depende de la temperatura y al aumentar ésta generalmente disminuye este factor y reduce la solubilidad y el tiempo pasado por los componentes de la muestra en la fase estacionaria.

En cromatografía de líquidos  $K$  esta controlada por la fuerza del solvente, se debe encontrar el más adecuado para una separación utilizando desde un solvente de débil fuerza hasta uno de mayor fuerza; dependiendo de que tan rápido sale el primer componente de la muestra los valores óptimos son de 2 a 6 y en muestras con más de 2 componentes el rango óptimo es  $1 < K < 10$ . Para encontrar que solventes son los más apropiados para una separación, existen tablas eluotrópicas que agrupan los solventes de acuerdo a su fuerza sobre la fase estacionaria.

## 2.6 CROMATOGRAFIA DE GASES

(18,19,20,21)

En la cromatografía de gases, la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna y la fase estacionaria es un sólido ( Cromatografía de Gas-Sólido ), ó un líquido ( Cromatografía Gas-Líquido ).

En cromatografía de Gas - Sólido. el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta el soluto y el soporte que puede ser carbón vegetal, alúmina, sílica gel. La adsorción diferencial sobre la superficie sólida es la base para la separación en esta cromatografía. ( CGS ).

En cromatografía Gas - Líquido. la separación se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida, que cubre a un sólido inerte, como sílica, vidrio. La fase líquida son compuestos orgánicos de alto punto de ebullición. Debido a la amplia gama de fases líquidas disponibles, la cromatografía Gas - Líquido ( CGL ) es la forma más selectiva y se presta a mayores usos.

## EQUIPO DE CROMATOGRAFIA DE GASES

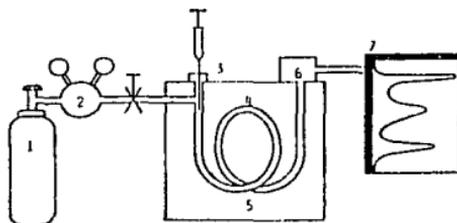


Figura 2. Las partes básicas para cromatografía de gases son : 1) cilindro de gas portador; 2) control de caudal de gas; 3) entrada de la muestra ( inyector ), 4) termostato de la columna ( horno ); 5) columna; 6) detector; 7) registro gráfico ( integrador )

En cromatografía de gases suceden varios eventos para obtener una separación gráfica de una muestra introducida. La muestra se inyecta (comunmente con una jeringa graduada en microlitros) en la cámara de inyección calentada, donde se vaporiza y es arrastrada por el gas portador inerte (helio ó nitrógeno) a lo largo de la columna (puede ser un tubo largo de metal ó vidrio relleno muy apretadamente de partículas sólidas), donde se producen de forma paulatina y sucesiva los procesos de retención y liberación de los componentes a distintas velocidades, dependiendo del poder de atracción que muestre la fase estacionaria sobre cada uno de los componentes que integran la mezcla. Como resultado de los procesos de separación, los componentes serán diferenciados al pasar a través de un detector. Este tipo de dispositivo mide la concentración de la muestra y genera una señal eléctrica. Esta señal pasa a un registrador gráfico, el cual configura un cromatograma (registro escrito del análisis).

**DETECTOR.** El detector de ionización de Llama, se basa en el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del gas. La muestra que sale de la columna llega a la llama y se mezcla el hidrogeno y el aire que la alimenta. cuando se queman los compuestos orgánicos en una llama de hidrógeno - aire, se obtienen partículas cargadas ó iones. El mecanismo exacto no se puede establecer, algunos autores están a favor de la ionización térmica mientras otros consideran que la oxidación es más importante; en todo caso se producen iones positivos y negativos más electrones libres cuando la muestra pasa por la llama. Un par de electrodos con un voltaje polarizado aplicado recoge estos iones y la corriente resultante se amplifica y es pasada al graficador.

El detector de ionización de Llama es alrededor de 1000 veces más sensible que el detector de conductividad térmica (el segundo de mayor uso) para la mayoría de los materiales pero hay algunos compuestos con los que tiene una respuesta baja ó ninguna.

Entre las sustancias que no dan respuesta figuran el aire, agua, los gases inertes ( por ejemplo Argón ). óxido de nitrógeno, haluros de silicónes, amoniaco, hidrógeno, nitrógeno, mono y bióxido de carbono, ácido fórmico. Por no responder al aire y al agua, este tipo de detectores es particularmente apropiado para el análisis de trazas de materia orgánica en el aire o en el agua ó de muestras acuosas, tales como bebidas alcohólicas, materiales biológicos, etc.

**GAS ACARREADOR:** El nitrógeno utilizado como gas acarreador es mejor que el helio por dos razones: La sensibilidad que se obtiene con el nitrógeno es dos veces mayor que con el helio y la alta densidad del nitrógeno reduce la expansión del pico en la columna y aumenta la eficiencia

El caudal de los gases es recomendado por una proporción de flujo. Donde el flujo del acarreador esta generalmente determinado por el diámetro de la columna, de 30 ml/ min para columnas de 1/8 de pulgadas y 50 - 60 para 1/4 de pulgada.

Acarreador	-----	2
Hidrogeno	-----	1
Aire	-----	8 - 10

## 2.7 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION ( CLAR ) ( 14,16,22,23,24 )

Este tipo de cromatografía, se fundamenta en la diferencia del equilibrio de distribución en una mezcla de componentes en fases heterogéneas, donde una de estas fases es un sistema líquido ( fase móvil ) que es forzado a pasar a través de un lecho estacionario ( fase estacionaria ) por bombas de alta presión.

Durante el trayecto, las moléculas migran a una velocidad que está en función del equilibrio de distribución dado por la interacción entre los componentes de la muestra y las fases, de tal manera que cada sustancia invierte un tiempo particular en pasar a través del sistema cromatográfico, este tiempo se denomina tiempo de retención ( TR ). Al salir la sustancia es rastreada por un detector para cuantificarla y posteriormente convertirla en una señal que se registra en forma de picos, éstos generalmente adquieren forma simétrica y gaussiana, debido a que el promedio de moléculas de soluto mantiene un equilibrio de distribución en su trayecto a través de la columna.

EQUIPO PARA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS  
DE ALTA PRESION

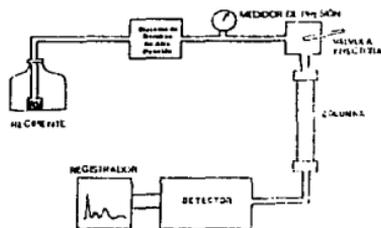


Figura 3. El equipo de cromatografía de líquidos está compuesto de: 1) reservorio de solventes; 2) bomba; 3) inyector; 4) columna; 5) detector; 6) graficador.

**DETECTOR.** Los detectores que se pueden clasificar como universales y específicos, dado que la mayoría de los compuestos orgánicos, especialmente los fármacos, tienen una estructura química con dobles enlaces, el detector que se podría clasificar como universal es el de ultravioleta. De cualquier manera se cuenta con una serie de detectores; como el de fluorescencia, electroquímico, de masas, índice de refracción e infrarrojo.

Detector de UV. Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de un haz de luz monocromático ultravioleta. Existe dos tipos de detectores: El de longitud de onda variable, cuya ventaja es la de poder seleccionar la longitud de onda óptima para la muestra, donde tenga el máximo de absorbancia, y el de longitud de onda fija que se emplea filtros a 210, 230, 254, 280 y 313 nm y una lámpara de deuterio a baja presión como fuente de luz UV.

Los detectores son insensibles a cambios de flujo y en la temperatura, además tienen como característica que el volumen de la celda es de 10 mL o menos para evitar el ensanchamiento de los picos dado a factores externos.

En la actualidad existen detectores capaces de hacer el barrido del compuesto para su posible identificación en un flujo continuo mediante un arreglo de diodos, con lo cual se puede barridos simultáneos de diferentes longitudes de onda que van desde 190 hasta 600 nm en milisegundos. La radiación de la lámpara de deuterio para a través de una lente y un obturador hacia la celda de flujo. La radiación emitida se dispersa por una rejilla de difracción hacia el arreglo de fotodiodos. Estas señales obtenidas pasan a un procesador de datos con lo cual resulta la respuesta

(absorción) en función del tiempo y de longitud de onda.

Para el empleo de los detectores de UV, la pureza espectrofotométrica de la fase móvil es importante, sin embargo se recomienda usar disolventes grado cromatográfico en vez de grado espectro, ya que estos contienen conservadores que afectan las separaciones.

Columnas. Son parte importante del método, ya que se lleva a cabo la separación y resolución de los componentes de la muestra. La fase estacionaria debe ser térmicamente estable y químicamente inerte con la fase móvil y con los solutos. La velocidad de separación depende de gran parte del empaque de la columna.

los requerimientos para los materiales de empaque de las columnas empleadas para CLAR incluyen:

- 1) Grandes superficies de contacto
- 2) Una capa de fina de adsorbente uniformemente distribuida
- 3) Superficie con estructura abiertas de fácil acceso para fase móvil
- 4) Estabilidad
- 5) Dificultad para ser comprimida por presiones altas

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas eficientes son de diámetro pequeño ( 3 mm ) y efectúan análisis muy rápidos; su capacidad en cambio es muy limitada y la muestra debe ser entonces de tamaño muy reducido, lo cual exige un detector muy sensible.

Para prolongar la vida de las columnas para CLAR se mencionan algunos consejos.

- a) Trabajar únicamente con disolventes y soluciones buffer previamente filtradas
- b) Inyectar solamente muestras filtradas
- c) evitar bases o ácidos fuerte, es decir, no trabajar fuera de pH 2 a 8.

- d) Evitar los esfuerzos mecánicos ( golpes, variaciones repetidas de la presión , vibraciones) ) y cambios rápidos de flujo ( no más de + 1 ml/ min ).
- e) Componer el sistema cromatográfico de tal modo que nunca se queden adsorbidas moléculas de la muestra de forma irreversible ni se precipiten en la columna.

Por consiguiente disolver las muestras en los mismos disolventes que sirven de eluyentes cuando sea posible.

Al inyectar muestras disueltas en sistemas amortiguados, procuren que las sales sean lo suficientemente solubles en la mezcla de eluyentes elegida ( existe el peligro de que precipiten las sales tampón sobre todo si es elevada la proporción de eluyentes orgánicos en la fase móvil y por tanto, se obstruya la columna)

- f) Procurar utilizar cada columna para una aplicación determinada, ya que la variación continua de muestras y eluyentes desgasta la columna y acelera la pérdida de eficacia separadora.

Uno de los factores importantes, que no es de índole instrumental pero repercute en la obtención de una buena eficiencia y resolución en CLAR es:

Fase móvil. Los disolventes correspondiente a la fase móvil deben ser desgasificados, ya que antes de colocarlos al contenedor o directamente en él para eliminar los posibles gases disueltos ( oxígeno ) que pueden reaccionar con la fase estacionaria.

Dichos solventes deben reunir las siguientes características:

- Poseer alta pureza
- No interactuar con el empaque
- Ser compatible con el detector
- Disolver la muestra
- Tener baja viscosidad
- Ser estable bajo las condiciones de trabajo
- Estar comercialmente accesible " bajo precio "
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener la polaridad adecuada para permitir la retención conveniente de la muestra en la columna

## 2.8 VALIDACION

( 24,25,26,27 )

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se comprueba y se certifica la capacidad de la metodología y asegura la obtención de resultados analíticos confiables y reproducibles. Así también se define; como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

En los procedimientos de análisis químicos se pueden encontrar varios tipos de errores, ya sea por su origen o causa y se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- A ) Sistemáticos
- B ) Aleatorios

Los errores sistemáticos; se conocen bajo los siguiente sinónimos: errores constantes y errores determinados. Este tipo de errores se producen siempre en la misma dirección, es decir, siempre en exceso o siempre en defecto pero nunca en ambas direcciones, afectan a todas las medidas de una serie de determinaciones y generalmente se pueden evitar o corregir.

Los errores sistemáticos pueden ser eliminados: calibrando los instrumentos antes de usarlos, purificar los reactivos antes de realizar una reacción química o valoración, aprendiendo a utilizar bien los equipos e instrumentos y por último no olvidar que la fatiga física y psíquica induce al error humano.

Errores Aleatorios: Se conocen también bajo los sinónimos de errores fortuitos, errores estadísticos, accidentales, indeterminados o casuales.

Los errores aleatorios son aquellos que se producen unas veces por exceso y otras por defecto, pero invariablemente los valores se alteran hacia uno y otro lado del valor real. Esto asegura que el valor real está contenido en un conjunto de mediciones de la misma magnitud.

Los errores afectan a todas las mediciones de una serie de determinaciones: estos no tienen el mismo valor en cada medición de manera que las medidas resultantes de una serie son ligeramente distintas y por tanto no se puede evaluar exactamente, ni evitar, ni corregir. Sólo se les puede reducir extremando precauciones.

Este tipo de errores siempre está presente, pero el hecho de que las medidas giren en torno del valor real, implica, que en este caso sí es representativo aplicarle un tratamiento estadístico.

Para disminuir este tipo de errores se recomienda realizar el mayor número posible de mediciones de una magnitud, el cálculo estadístico de 10 a 20 mediciones; ya que este número proporciona una buena estimación de los límites entre los cuales se puede encontrar el valor real de una magnitud.

Para validar un método, se han establecido diferentes criterios. los parámetros mínimos para la evaluación de los métodos analíticos dependiendo del tipo de uso de este se presenta a continuación en tabla ( IX ) donde se muestran los parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método.

PARÁMETRO	UNIDAD DE CALIDAD	ESTADÍSTICO DE CALIDAD		SÍMBOLO	REPLICACION DEL DATOS	
		BAJO NÚMERO DE MEDICIONES	ALTA NÚMERO DE MEDICIONES		SE CUANDO LA UNIDAD COMO DE REPETICIÓN	SE CUANDO DE UNIDAD FUENTE DE OPERACION
PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA	R	R	R	R	R	R
LÍMITE DE DETECCIÓN		R				
LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN		R				
EFECTIVO Y ESTABILIDAD DEL SISTEMA	R	R	R	R	R	R
REPLICACIÓN DEL SISTEMA	R	R	R	R	R	R
REPLICACIÓN (INFORMACIÓN)	R	R	R	R	R	R
REPLICACIÓN (FUENTE DE CALIDAD)	R	R	R	R	R	R
REPLICACIÓN (OPERACION)		R	R	R		
REPLICACIÓN DEL SISTEMA		R	R	R		R
REPLICACIÓN DE LA UNIDAD	R	R	R	R		

Tabla IX. Parámetros establecidos para la validación de métodos analíticos dependiendo de la aplicación del método. (26)

Parámetros estadísticos de evaluación del método.

**LINEALIDAD.** La linealidad de un sistema o método analítico, es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de su transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

-----  
 TABLA VI. CRITERIOS PARA LA LINEALIDAD DEL METODO  
 -----

Coeficiente de variación ( CV )	-----	1.5%
Coeficiente de correlación ( r )	-----	0.99
Coeficiente de determinación ( r )	----	0.98
Pendiente	( m )	---- 1.00
Ordenada	( b )	---- 0.00

-----

Tabla X. Criterios de aceptación para la linealidad del método analítico de valoración. ( 26 ).

Los porcentos recuperados y los coeficientes de variación a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla ( XI )

-----  
 TABLA XI. CRITERIO DE ACEPTABILIDAD PARA  
 LINEALIDAD  
 -----

METODO	PORCIENTO DE RECOBRO			CV
Cromatográfico	98	-	102 %	2 %
Volumétricos	98	-	102 %	2 %
Químicos y espectro fotométricos	97	-	103 %	3 %
Microbiológicos	95	-	105 %	5 %

Nota: Para suspensiones y semisólidos se acepta una ampliación del 1 % en el intervalo expresado en el promedio de recobro y 3 % de CV %.

**PRECISION.** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de un muestreo homogéneo del producto, usualmente se expresa en términos de desviación estándar o de coeficiente de variación.

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

- a) Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada a la concordancia obtenida entre determinaciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)

#### CRITERIO PARA REPETIBILIDAD

El porciento recuperado y el CV debera de estar de acuerdo en la tabla XI.

- b) Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes ( diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorio, utilizando el mismo y/o en diferentes equipos, etc )

---

#### CRITERIOS PARA REPRODUCIBILIDAD

---

METODO	CV
Cromatográficos	2 %
Químicos y Espectrofotométricos	3 %
Microbiológicos	5 %

---

**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 del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

**CRITERIO.** El porcentaje recuperado y el CV deberán de estar de acuerdo con la TABLA VII.

**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.

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

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

**CRITERIO.** Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado, ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se requieren técnicas y métodos confiables en la elaboración de productos farmacéuticos, así como para su cuantificación. La validación de todos los procesos que intervienen en la elaboración de los productos ( proveedores, limpieza, fabricación, análisis, etc ) es una norma establecida en el lugar donde se realice el presente trabajo. Además que es una norma sanitaria de la Secretaría de Salud, donde pide a los laboratorios fabricantes de medicamentos, que tanto sus procesos de fabricación, como los métodos; sean validados, para que de esta manera se obtenga un medicamento seguro en todo aquello que pueda afectarlo en su fabricación, además de ser eficaz en cuanto a su acción terapéutica ( Diario Oficial de la Federación 18 de Enero de 1988 )

En la actualidad se han estado modificando los métodos de cuantificación de los productos farmacéuticos por C. Gases y CLAR . ( 4, 5 ). Debido a esto; se tienen dos métodos analíticos propuestos para la separación y cuantificación de Noretindrona y Etilnil Estradiol (Cromatografía de gases y Cromatografía de Líquidos de Alta Presión) tanto en granulado, como en tabletas. Nuestro trabajo será optimizar y validar las dos técnicas ya propuestas para su cuantificación de los dos principios activos en una misma corrida cromatográfica. Ya logrado lo anterior, aplicar el estudio estadístico adecuado para la comparación de los dos métodos, para obtener si son equiparables entre sí.

### 3.2 OBJETIVOS

Optimizar las técnicas analíticas para la separación y cuantificación de Noretindrona y Etil Estradiol por Cromatografía de gases y Cromatografía de Líquidos de Alta Presión en una misma corrida. en un producto farmacéutico en presentación de tabletas. ( tanto en granulado, como en tableta )

Aplicación de los parámetros estadísticos adecuado para la validación de los métodos analíticos para control de calidad en la cuantificación de Noretindrona y Etil Estradiol.

### 3.3 HIPOTESIS

Tomando como referencia el comportamiento cromatográfico del Etinil Estradiol y Noretindrona, en su forma de cuantificación simultanea en una sola corrida, se podrán modificar y validar, los métodos cromatográficos ya propuestos ( Cromatografía de Gases y Cromatografía de Líquidos de Alta Presión ) para su adecuada separación y cuantificación.

## 3.4 REACTIVOS Y EQUIPO

## MATERIALES

MATERIAL -----	DESCRIPCION -----
Matraces volumétricos	5, 10, 50, 100 ( ml )
Pipetas volumétricas	1, 2, 3, 4, 5, 10 ( ml )
Vasos de precipitados	40, 50 ( ml )
Jeringas	5 ( ml )
Probetas	250, 500 ( ml )
Kitasatos	1000 ( ml )
Mortero con pistilo	
Pipetas Pauster	
Membranas de filtración	FH y HA de 0.45 micras Millipore
Viales con casquillos	2 ( ml )
Baño de ultrasonido	International Equipment Co.
Filtros para muestras	Millipore

## REACTIVOS

REACTIVO -----	DESCRIPCION -----
Sustancias de referencia -----	
Noretindrona	Syntex
Etinil Estradiol	Syntex
Solventes	
Cloroformo	Merck R.A
Metanol	Merck HPLC
Agua	HPLC

<u>EQUIPO</u>	<u>DESCRIPCION</u>
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión	Hewlett Packard 1050
Cromatógrafo de Gases	Hewlett Packard 5890
Integrador	Hewlett Packard 3396-A
Columna ( HPLC )	Nova-pack fenilo ( Millipore ) 3.9mm x 15 cm
Columna ( C. Gases )	XE-60 al 3% de 6ft largo y 0.4mm de diámetro.
Centrifuga	International Equipment Co.

---

**CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PARA C. GASES**

---

Temperatura del horno	-----	220 C
Temperatura del detector	-----	260 C
Temperatura del inyector	-----	260 C
Volumen de inyección	-----	3 mL
Flujo de Nitrógeno	-----	40 ml/ min
Velocidad de carta	-----	0.1 cm/ min

---

---

**CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PARA CLAR**

---

Fase móvil	-----	Metanol-Agua 55 : 45
Flujo	-----	1 ml/ min
Presión	-----	140 bar = 2800 psi
Volumen	-----	40 mL/min
Longitud de onda	-----	230 nm
Velocidad de carta	-----	0.1 cm/min
Temperatura horno	-----	40 C

---

### 3.5 METODOLOGIA

Para poder realizar la implementación y la validación de los métodos analíticos para la cuantificación de Etinil Estradiol y Noretindrona en granulado y tabletas, se tuvo la necesidad de fabricar un lote de placebo bajo las condiciones requeridas de producción y al cual se le adicionaron para cada ensayo cantidades conocidas de noretindrona y etinil estradiol. ( 29,30 )

#### METODO PARA CROMATOGRAFIA DE GASES

Preparación del Estándar. Pesar exactamente 10.5 mg de etinil estadiol y colocarlo en un matraz de 100 ml y disolver con 30 ml de cloroformo y colocarlo en el ultrasonido por 5 minutos. dejar que llegue a temperatura ambiente y aforar con cloroformo .

Estándar de Noretindrona, se realiza pesando 12 mg de noretindrona y colocarlos en un matraz de 10 ml, disolver y aforar con la solución de etinil estradiol.

Preparación de la muestra. Homogeneizar el granulado en un mortero. Pesar el equivalente a tres tabletas y transferirlo a un tubo de ensayo. Adicionar 3 ml de agua poner en un baño de vapor durante 5 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y añadir 1 ml de cloroformo. agitar 3 minutos y centrifugar por 10 min. A través de una pipeta Pauster, tomar la fase orgánica ( parte inferior ) y colocarlo dentro de los viales.

Las condiciones cromatograficas del equipo: son las ya antes mencionadas.

**METODOLOGIA PARA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS  
DE ALTA PRESION**

**Preparación del Estándar.**

Estándar de Noretindrona. Pesar exactamente 9 mg de noretindrona y transferirlo a un matraz volumétrico de 100 ml y agregar unos 30 ml de metanol HPLC y poner en el ultrasonido por 4 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Aforar al volumen con metanol HPLC.

Estándar de Etinil estradiol. Pesar exactamente 7mg de Etinil estradiol y transferirlo a un matraz volumétrico de 100 ml. Agregar unos 30 ml de metanol HPLC y poner al ultrasonido por 4 minutos. Dejar que se enfríe a temperatura ambiente. Aforar con metanol HPLC.

Estándar de trabajo. En un matraz de 10 ml agregar 1 ml de estándar de etinil estradiol y aforar con la solución de noretindrona.

Preparación de la muestra. Pesar exactamente el equivalente a una tableta y transferirlo a un matraz de 5 ml. Agregar 3 ml de metanol HPLC y ponerlo en el ultrasonido por 5 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar. Agitar por 3 minutos. Vaciar el contenido de los matraces, en las jeringas con filtros para muestras. Por último pasarlos a los viales para ser inyectados en el cromatógrafo.

Condiciones cromatograficas ya antes mencionadas.

### 3.6 VALIDACION ESTADISTICA DEL METODO

( 26 )

#### 3.6.1 Diseño Experimental Para Evaluar Cada Parámetro Estadístico

Los procedimientos generales para la validación de los métodos por CLAR y C.Gases. Acontinuación se mencionaran los criterios de aceptación para cada uno de ellos.

**LINEALIDAD.** La determinación se realiza con cinco concentraciones diferentes y tres replicas de cada concentración.

Las concentraciones de los placebos cargados van del 60, 80, 100, 120, 150 % del valor marcado en el marbete. Se calculó la pendiente de la curva (  $m$  ), intercepto (  $b$  ), coeficiente de correlación (  $R$  ) y el error estándar de regresión (  $S_{xy}$  ).

**PRECISION.** Para determinar la precisión, se realiza con dos analistas en dos días diferentes con tres determinaciones por analista / día para hacer un total de 12 determinaciones. Calcular la media (  $X$  ). Posteriormente se realiza un análisis de varianza.

**EXACTITUD.** Para determinar la exactitud del método se prepararon 10 muestras y un estándar de acuerdo al método general de análisis propuesto. Se calculó el promedio de recobro (  $X$  ), desviación estándar (  $S$  ) e intervalo de confianza al 95 %..

**ESPECIFICIDAD ANTE EXCIPIENTES.** Se valoraron muestras por triplicado de placebo ( excipientes ), placebo adicionado ( excipiente más estándar ) con el método propuesto. Para comprobar que no existe interferencia alguna del placebo y el placebo adicionado deberá dar respuesta parecida al estándar.

### 3.6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LA COMPARACION DE LOS METODOS ANALITICOS

A continuación se en lista los parámetros a comparar, así como los criterios para establecer la igualdad de dichos parámetros.

#### REPETIBILIDAD.

Criterio: El intervalo de confianza para la razón de varianzas ( calculada a partir del porcentaje recuperado de exactitud al 100 % del porcentaje recuperado de linealidad del método y de la varianza del método de estudio de precisión ) debe localizarse el valor de 1.

#### EXACTITUD AL 100 %

Criterio: El intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado, debe localizarse el valor de cero dentro del intervalo.

#### LINEALIDAD DEL METODO.

- I El intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado, debe localizarse el valor de cero dentro del intervalo.

- II El intervalo de confianza para la diferencia de la pendiente de cantidad adicionada - cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero dentro del intervalo .
- III El intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen de cantidad adicionada - cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero dentro del intervalo.

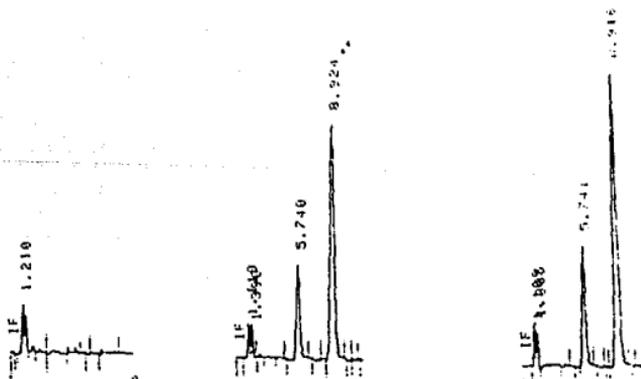
#### 4. R E S U L T A D O S

## 4.1 ESPECIFICIDAD FRENTE A EXCIPIENTES.

Para realizar esta prueba se sometieron los estándares a degradación en medio ácido; con ácido clorhídrico concentrado y medio básico; con hidróxido de sodio concentrado y de oxidación; con peróxido de hidrógeno. donde no se presentó ninguna interferencia, debido a que son fármacos muy estables. Además se prepararon tres soluciones. Una que contenga el placebo del producto. otra con el placebo cargado y comparados con los estándares de Noretindrona-Etinil estradiol como mezcla. Los resultados obtenidos son los siguientes cromatogramas.

## CROMATOGRAMAS DEL ENSAYO DE ESPECIFICIDAD

## PARA EL METODO DE CROMATOGRAFIA DE CLAR



Placebo del  
producto

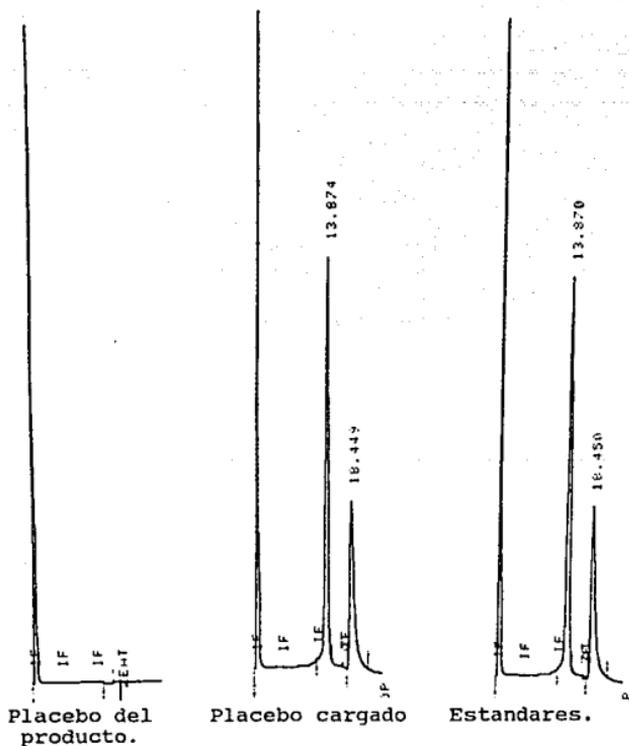
Placebo cargado

Estándares

TR = 5.741 Etinil estradiol  
TR = 8.916 Noretindrona

Fase móvil metanol-agua 55 : 45, longitud de onda 230 nm,  
flujo de 1 ml/ min, volumen de inyección 40 µl.

CROMATOGRAMAS DEL ENSAYO DE ESPECIFICIDAD  
PARA EL METODO CROMATOGRAFICO DE GASES.



TR = 13.870 Noretindrona  
TR = 18.450 Etinil estradiol

Temperaturas: Horno 220 C, detector 260 C e inyector 260 C,  
volumen de inyección 3 mL. Acarreador Nitrogeno 40 ml/min.

## EVALUACION DE LA INTERFERENCIA DE EXCIPIENTES.

**Hipótesis:**

**Ho:** No hay interferencia de excipientes

**Ha:** Hay interferencia de excipientes.

Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar las sustancias de interés de cualquier interferencia presente. De no ser así, optimizar el método o desarrollar otro.

Por lo anterior de la hipótesis y al observar los cromatogramas para cada método ( CLAR y C Gases ), Se rechaza la hipótesis Ha. y podemos considerar que el método desarrollado es capaz de separar la sustancia de interés de las demás sustancias presentes.

#### 4.2 LINEALIDAD PARA NORETINDRONA

##### 4.2.1 LINEALIDAD PARA NORETINDRONA POR C. GASES.

Para conocer la linealidad del método se analizaron placebos cargados por triplicado al 60, 80, 100, 120 y 150 % de la cantidad etiquetada. En el siguiente Cuadro No. 1, se muestran los resultados de las cantidades recuperadas en función de las cantidades adicionadas.

#### LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO DE GASES PARA NORETINDRONA

Cantidad adicionada ( mg )	Cantidad recuperada ( mg )
7.2	7.1893
7.2	7.2246
7.2	7.1791
9.6	9.5968
9.6	9.6254
9.6	9.6321
12.0	12.0030
12.0	12.0582
12.0	12.9764
14.4	14.3690
14.4	14.3797
14.4	14.4020
18.0	17.9989
18.0	18.0134
18.0	17.9907

CUADRO 1. Relación de las cantidades adicionadas y recuperadas para evaluar la linealidad del método de noretindrona por C. Gases.

A continuación se presentan los valores obtenidos a través de la evaluación de la regresión lineal, para noretindrona por cromatografía de gases. (ecuaciones 1-6)

Cantidad adicionada		cantidad recuperada	
media :	12.24	media:	12.2425733
Sx :	3.748919	Sx :	3.745323
Ex :	183.6	Ex :	183.6386
Ex <sup>2</sup> :	2458.8	Ex <sup>2</sup> :	2458.6208

Exy: 2458.34616

E( Xi-X ) : 210.067252

b : 0.0145513

m : 0.9990214

r : 0.9999806

r<sup>2</sup> : 0.9999612

Se realizara una evaluación estadística, utilizando el estadígrafo t de student para determinar si nuestro método tienen una ordena al origen considerada como cero.

#### EVALUACION DE HIPOTESIS PARA LA ORDENADA

HO : b = 0

HA : b ≠ 0

Utilizando la ecuación 8 del anexo, para calcular la t calculo.

$$t \text{ cal} = \frac{b - B}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum E x^2}{n E (X_i - X)^2}}}$$

$$t \text{ cal} = \frac{0.0145513 - 0}{0.25018762 \sqrt{\frac{2458.08}{15 (210.067252)}}}$$

$$t \text{ cal} = 0.658513418$$

#### Estadigrafo de contraste

$$t \text{ Tab} = 0.05 \text{ g.l } n-2 \quad t \text{ 0.975} \text{ g.l } n-2$$

$$t \text{ cal} < t \text{ 0.975} = 2.1604$$

$$t \text{ cal} > t \text{ 0.025} = -2.1604$$

por lo que tenemos:

$$-2.1604 < 0.0658513 < + 2.1604$$

Se considera nuestro método posee una ordenada al origen considerada como cero, ya que se encuentra dentro del área de aceptación.

## INTERVALO DE CONFIANZA ( I C )

Usando la ecuación 9 del anexo se calcula el I.C

$$a + t_{1 - \alpha/2} ( S_{y/x} )$$

$$\sqrt{\frac{E \times}{n E ( X_i - X )^2}}$$

$$0.0145513 + 2.16 ( 0.0250187 )$$

$$\sqrt{\frac{1382.67}{15 ( 210.067 )}}$$

$$0.0145513 + 0.047730$$

$$I.C. = -0.0331787 \quad a \quad 0.0622813$$

## EVALUACION DE LA PENDIENTE

Ecuación 10 del Anexo.

Prueba de Hipótesis

Estadigrafo de contraste

$$H_0 : b = 1$$

$$t_{cal} < t_{Tab} ( 0.975 )_{g.1} (n-2)$$

$$H_a : b \neq 1$$

$$t_{cal} > t_{Tab} ( 0.025 )_{g.1} (n-2)$$

$$t_{cal} = \frac{( b - B ) S_X \quad n - 1}{S_{y/x}}$$

$$t \text{ cal} = \frac{(0.9999806 - 1) (3.8805) \sqrt{15 - 1}}{0.025018762}$$

$$t \text{ calculo} = -0.011258762$$

#### Area de Aceptación

$$t \text{ cal} < t_{0.975} (n - 2) + 2.1604$$

$$t \text{ cal} > t_{0.025} (n - 2) - 2.1604$$

Si se acepta nuestro método posee una b considerada como uno.

$$- 2.1604 < -0.01125868 < -2.1604$$

Nuestra t calculo se encuentra dentro del intervalo de aceptación, por lo tanto podemos considerar que la pendiente ( b ) posee un valor semejante a 1.

#### INTERVALO DE CONFIANZA

Para calcular el intervalo de confianza, para la pendiente se utilizo la ecuación 11 del anexo.

$$m \quad t \text{ Tab} \quad \frac{S_y / x}{S_x \sqrt{n - 1}}$$

$$0.9999806 + 2.16 \quad \frac{0.025078762}{3.8805 \sqrt{15 - 1}}$$

$$0.996196 \quad a \quad 1.00376$$

A partir de los resultados del Cuadro No.1. También se evaluó el porcentaje medio de cada nivel y los coeficientes de variación.

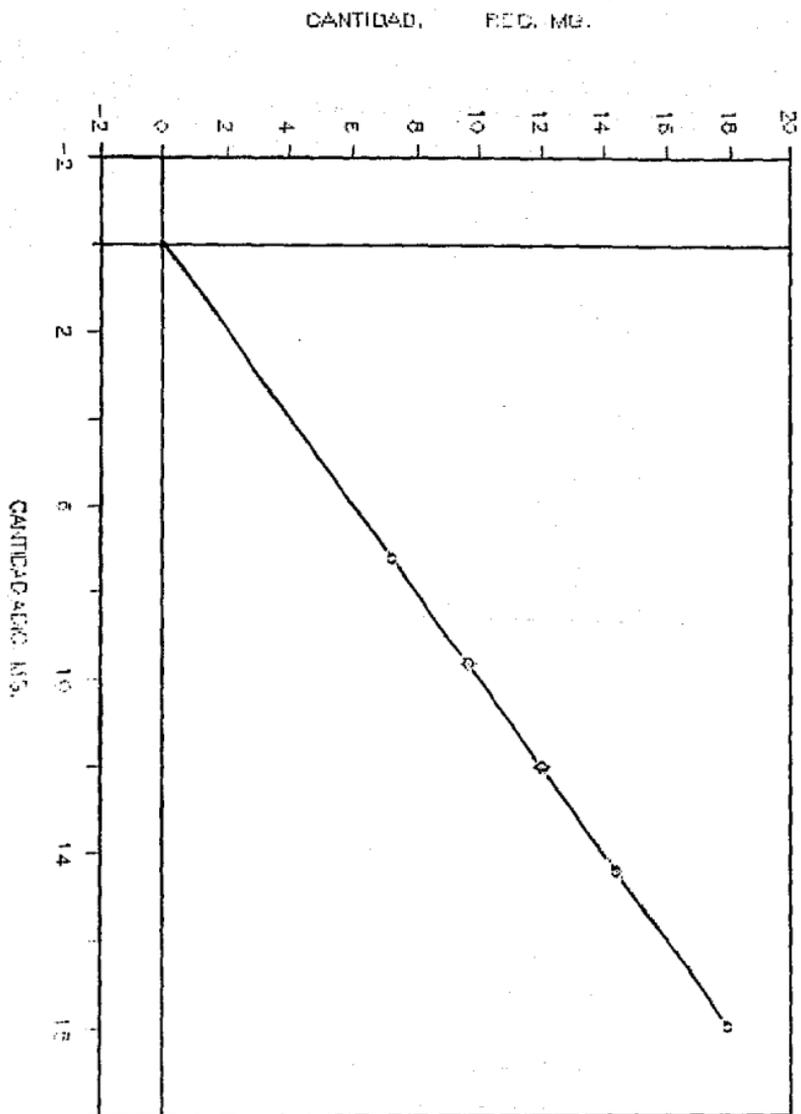
PORCIENTO MEDIO DE RECOBRO Y C. V PARA CADA NIVEL DE NORETINDRONA POR C. GASES.		
NIVEL	% DE RECOBRO	C.V %.
150 %	100.00	0.45
120 %	99.79	0.21
100 %	100.10	0.34
80 %	100.18	0.19
60 %	100.00	0.32
GLOBAL	100.02	0.30

CUADRO No.2. Se describen los valores encontrados entre las tres diferentes muestras de cada nivel, obteniendo se su valor medio y su coeficiente de variación entre ellos.

Tanto los porcentos de recobro, como los coeficientes de variación de cada nivel, así, como el global deben encontrarse de acuerdo a los rangos establecidos en la tabla No. IX. Donde especifica que para los métodos cromatográficos, los porcentos de recobro deben ser de 98-102 % y los coeficientes < 2 %. Como podemos observar en el Cuadro No 2. todos los niveles, así como el global, cumplen con estos requerimientos.

# LINEALIDAD GASES

NORTRIUFONIA



## LINEALIDAD PARA NORETINDRONA POR CLAR.

La linealidad del método, se realizó de igual manera que para cromatografía de gases, con cinco niveles. de 60, 80, 100, 120 y 150 % de concentración con respecto a la etiquetada. las cantidades recuperadas aparecen en el cuadro2.

LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO	
CLAR PARA NORETINDRONA	
Cantidad Adicionada ( mg )	Cantidad Recuperada ( mg )
5.40	5.4522
5.40	5.3863
5.40	5.4072
7.20	7.2404
7.20	7.2404
7.20	7.1571
9.00	8.9613
9.00	8.9970
9.00	8.9623
10.80	10.7974
10.80	10.7604
10.80	10.8158
13.50	13.5406
13.50	13.5781
13.50	13.5144

CUADRO No 3. Relación de las cantidades adicionadas y recuperadas para evaluar la linealidad del método de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión para Noretindrona.

Se obtienen A partir de los resultados del Cuadro No 2, los siguientes valores estadísticos de cada columna. ( ecuaciones 1-6 )

Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada
Media : 9.18	Media : 9.184886
Sx : 2.9103755	Sx : 2.91977
Ex : 137.7	Ex : 137.7729
Ex <sup>2</sup> : 1382.67	Ex <sup>2</sup> : 1384.7729

$$\begin{aligned}
 b &= -0.02409 \\
 m &= 1.00031536 \\
 r &= 0.9999261 \\
 S_{y/x} &= 0.0368126 \\
 E ( X_i - X )^2 &= 119.3488
 \end{aligned}$$

Se realizara una evaluación estadística, utilizando el estadígrafo t de student para determinar si nuestro método tiene una ordenada al origen considerada como cero.

EVALUACION DE HIPOTESIS

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

PARA LA ORDENADA

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

$$t \text{ calc} < t \text{ 0.975 g.l (n-2)}$$

$$t \text{ calc} < 2.16$$

$$t \text{ calc} > t \text{ 0.025 g.l (n-2)}$$

$$t \text{ calc} > - 2.16$$

Utilizando la ecuación 8 del Anexo para calcular la t de calculo, encontramos.

$$t \text{ calc} = \frac{-0.02409 - 0}{0.0368126 \sqrt{\frac{1382.67}{15 ( 119.3488 )}}}$$

$$t \text{ calculo} = -0.74462148$$

#### AREA DE ACEPTACION

$$- 2.1604 < t \text{ calculo} = -0.74462148 < 2.1604$$

Por lo tanto nuestro método posee una ordenada al origen considerada como cero, ya que se encuentra dentro del área de aceptación.

#### INTERVALO DE CONFIANZA

A partir de la ecuación 9 del Anexo se calcula el intervalo de confianza.

$$-0.2409 + 2.16 ( 0.0368126 )$$

1382.67
-----
15 ( 119.3488 )

$$-0.0939701 \quad a \quad + 0.0457901$$

#### EVALUACION DE LA PENDIENTE

PRUEBA DE HIPOTESIS

$$H_0 : m = 1.$$

$$H_a : m \neq 1$$

CRITERIO DE ACEPTACION

$$t \text{ calc} < 2.1604$$

$$t \text{ calc} > -2.1604$$

Para evaluar la pendiente se utiliza la ecuación 10 del Anexo.

$$t_{\text{cal}} = \frac{(1.0031536 - 1) \cdot 2.9103755 \sqrt{15 - 1}}{0.036812623}$$

$$t_{\text{calculo}} = 0.932873$$

$$- 2.1604 < 0.932873 < + 2.1604$$

Por lo tanto podemos considerar nuestro método tiene una pendiente considerada como uno.

#### INTERVALO DE CONFIANZA

Para calcular el intervalo de confianza se utilizo la ecuación 11 del Anexo.

$$1.0031536 + 2.1604 \pm \frac{0.036812623}{2.9103755 \sqrt{15 - 1}}$$

$$0.9958517 \quad \text{a} \quad 1.010455$$

Así también, se realiza la evaluación de la variación de recobro en cada nivel a través de todo el intervalo de la linealidad.

PORCENTAJE PROMEDIO DE RECOBRO Y C.V PARA NORETINDRONA EN LA LINEALIDAD POR CLAR		
NIVEL	% DE RECOBRO	C.V %
150 %	100.36	0.24
120 %	99.96	0.26
100 %	99.70	0.22
80 %	99.99	0.58
60 %	100.05	0.62
GLOBAL	100.05	0.25

CUADRO No 4. Es la representación de las variaciones obtenidas durante el estudio de la linealidad para noretindrona por CLAR.

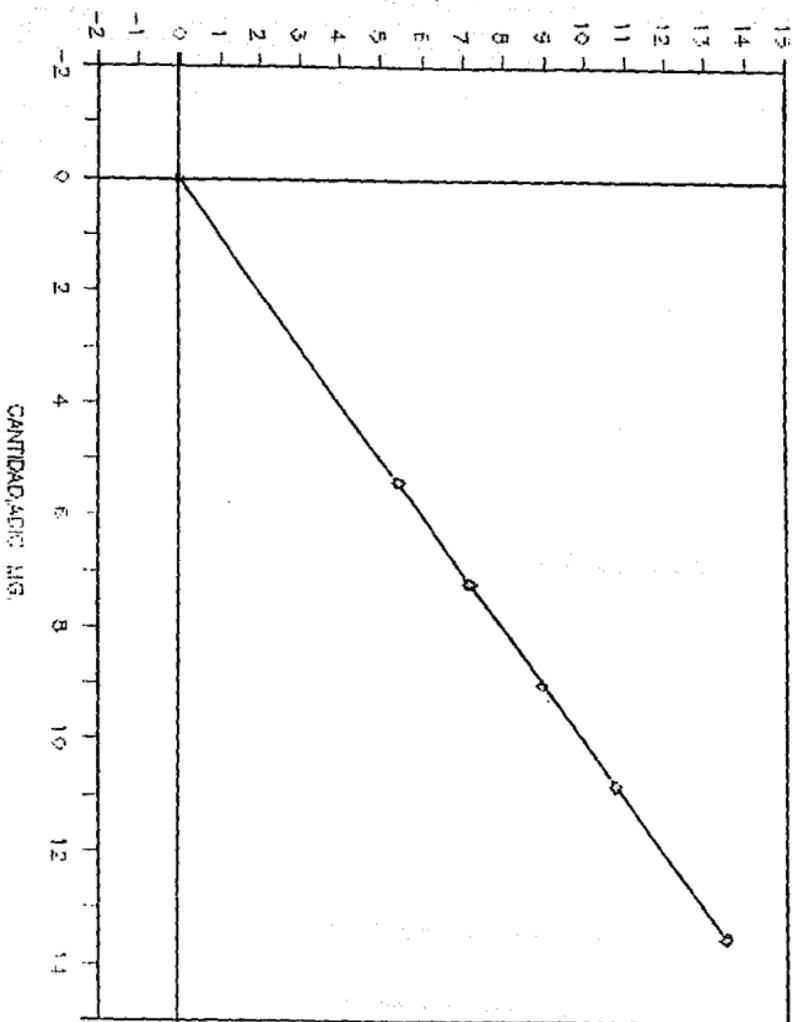
Los porcentajes de recobro y los coeficientes de variación a cada nivel y en el global, deben encontrarse dentro de los valores de aceptación para métodos cromatograficos especificados en la tabla I, donde los porcentajes de recobro deben encontrarse dentro del rango 98 - 102 % y los coeficientes de variación < 2 %.

Como en todos los niveles, así como el global se encuentran dentro del área de aceptación podemos decir que cumple con los requerimientos para un método cromatográfico.

# LINEALIDAD LIQUIDOS

NOFETHIDROXIA

CANTIDAD, REC. MG.



4.2.3 COMPARACION ESTADISTICA DE LOS DOS METODOS DE  
 CUANTIFICACION DE NORETINDRONA A TRAVES DE LA  
 PENDIENTE.

Acontinuación se evaluarán estadísticamente los dos métodos para determinar si son equiparables entre sí, para la cuantificación de noretindrón. A través de la pendiente.

$$M1 = \text{CLAR} \quad m_1 = M_1$$

$$M2 = \text{C.Gases} \quad m_2 = M_2$$

PRUEBA DE HIPOTESIS

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

$$H_0 : M1 = M2$$

t STUDENT

$$H_a : M1 \neq M2$$

Se calcula a partir de la ecuación 12 del Anexo.

$$t \text{ calc} = \frac{M1 - M2}{S1 y/x + S2 y/x \sqrt{\frac{1}{Ex1 - \frac{(Ex1)}{n1}} + \frac{1}{Ex2 - \frac{(Ex2)}{n2}}}}$$

$$t \text{ calc} = \frac{0.99689696 - 1.0014147}{(0.016877) + (0.0974987) \sqrt{\frac{1}{36.43-764.69} + \frac{1}{1881.96-1720.56}}}$$

$$t \text{ calc: } -04515554$$

## AREA DE ACEPTACION

$$g.l : ( n - 2 ) ( n - 2 )$$

$$t \text{ calc} < t 1 - \frac{\alpha}{2} \quad \text{ó} \quad t 0.975 = 2.056$$

$$t \text{ calc} > t \frac{\alpha}{2} \quad \text{ó} \quad t 0.025 = -2.056$$

$$-2.056 < -0.4515554 < +2.036$$

Se considera que los dos métodos poseen una pendiente equivalente entre si.

### 4.3 LINEALIDAD PARA ETINIL ESTRADIOL.

#### 4.3.1 LINEALIDAD PARA LA CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL POR C.GASES.

Para determinar el parámetro estadístico de linealidad en método cromatográfico de gases en la cuantificación de etinil estradiol. se analizaron placebos cargados por triplicado a la concentración de 60, 80, 100, 120, 150 % correspondiente a la etiquetada. En el cuadro 5 se presentan estos resultados.

LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO DE GASES PARA ETINIL ESTRADIOL	
Cantidad Adicionada ( mg )	Cantidad Recuperada ( mg )
6.30	6.3508
6.30	6.2780
6.30	6.2970
8.40	8.3870
8.40	8.4111
8.40	8.3980
10.50	10.4571
10.50	10.5238
10.50	10.5337
12.60	12.5840
12.60	12.6190
12.60	12.6224
15.75	15.7848
15.75	15.7358
15.75	15.7865

CUADRO No 5. Relación de las cantidades adicionadas y recuperadas para la evaluación de la linealidad del método C.Gases para la cuantificación de etinil estradiol.

A partir de los resultados del cuadro 5. se obtienen los siguientes valores.

Cantidad Adicionada		Cantidad Recuperada	
Media	: 10.71	Media	: 10.7179
Sx	: 3.395438	Sx	: 3.4003416
Ex	: 160.65	Ex	: 160.7694
Ex <sup>2</sup>	: 1881.9675	Ex <sup>2</sup>	: 1884.993

$$b = -0.007187$$

$$m = 1.001414$$

$$r = 0.9999706$$

$$r^2 = 0.9999412$$

$$S_{y/x} = 0.09749$$

$$E_{xy} = 161.406$$

#### EVALUACION DE LA ORDENADA

Evaluación de Hipótesis

Criterio de aceptación

$$H_0 : b = 0$$

$$t_{\text{calc}} < +2.1604$$

$$H_a : b \neq 0$$

$$t_{\text{calc}} > -2.1604$$

Utilizando la ecuación No. 8 del Anexo, para el calculo de t de student para la ordenada.

$$t_{\text{calc}} = \frac{-0.00718230 - 0}{0.0974987 \sqrt{\frac{1881.9675}{161.406}}}$$

$$t \text{ calculo} = -0.09476837$$

por lo tanto:

$$-2.1604 < -0.0947683 < +2.1604$$

Nuestro método por cromatografía de gases para Etilnil estradiol, tiene una ordenada al origen considerada como cero.

#### INTERVALO DE CONFIANZA.

A través de la ecuación No. 9 de Anexo, se obtiene:

$$-0.00718236 + 2.16 ( 0.0974987 )$$

1881.9675
-----
15 ( 161.406 )

$$-0.00718236 + 0.163701944$$

El intervalo de confianza se encuentre de:

$$-0.4708842 \quad a \quad 0.156519$$

#### EVALUACION DE LA PENDIENTE

Evaluación de Hipótesis

Criterio de Aceptación

$$H_0 : m = 1$$

$$t \text{ calc} < t_{0.975} = 2.1604$$

$$H_0 : m \neq 1$$

$$t \text{ calc} > t_{0.025} = -2.1604$$

Análisis a través de la ecuación 10 del Anexo.

$$t \text{ calc} = \frac{( 1.00141411 - 1 ) ( 3.395438 )}{0.097498717} \quad \frac{15 - 1}{15}$$

$$t \text{ calculo} = 0.184266$$

por lo tanto:

$$-2.1604 < 0.1842 < +2.1604$$

Debido a que  $t$  de calculo se encuentra dentro del rango de aceptación. Se considera a nuestro método que posee una pendiente igual a uno.

#### INTERVALO DE CONFIANZA

Utilizamos la ecuación 11 para su calculo.

$$1.001414 + 2.1604 \left[ \frac{0.0974987}{3.395438116 \quad 15 - 1} \right]$$

$$1.001414 + 0.16574$$

El intervalo es :

$$0.984840 \quad \text{a} \quad 1.017989$$

Se evaluaron los porcentos de recobro, así como los coeficientes de variación de cada nivel para etinil estradiol por cromatografía de gases obteniendo se los siguientes resultados que se muestran en el cuadro No.6.

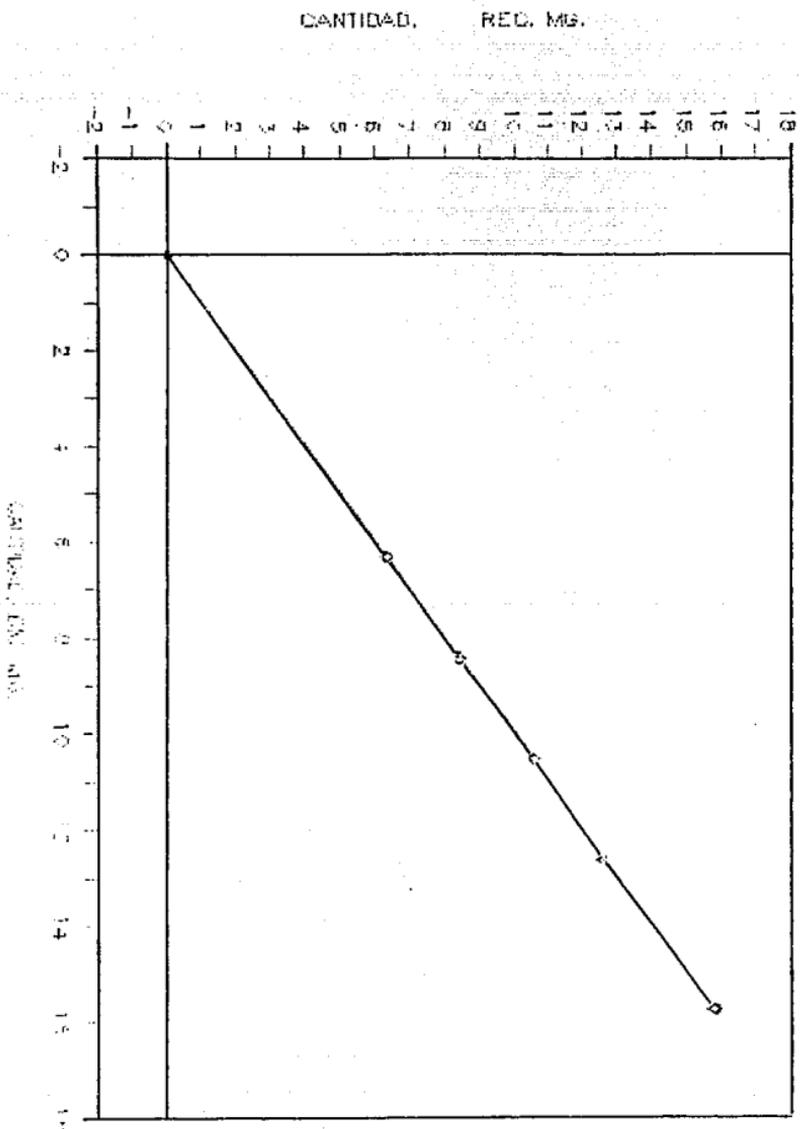
PORCENTAJE PROMEDIO DE RECOBRO Y C.V DE CADA NIVEL. PARA ETINIL ESTRADIOL POR C. GASES		
NIVEL	% DE RECOBRO	C.V %
150 %	100.12	0.181
120 %	100.07	0.168
100 %	100.04	0.396
80 %	99.98	0.143
60 %	100.13	0.598
GLOBAL	100.19	0.273

CUADRO No 6. Evaluación de las replicas de cada nivel, donde se observa los porcentos promedio de recobro, a si como los coeficientes de variación entre ellos.

Al observar el cuadro No. 6, se puede apreciar que los porcentos de recobro, se encuentran dentro del rango de 98 - 102 %, así como los coeficientes de recobro son menores al 2 %. con lo que podemos considerar que no hay diferencia significativa entre cada nivel, y la respuesta del método no se ve afectada, ya sea por exceso o por disminución de la concentración del principio activo.

# LINEALIDAD CASES

FINIL ESTIADNOL



#### 4.3.2 LINEALIDAD PARA ETINIL ESTRADIOL POR CLAR.

La linealidad para etinil estradiol a través de la cuantificación por el método CLAR, se realizó de igual manera que en C.Gases. cinco niveles; tres replicas de cada nivel.

LINEALIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO DE  
CLAR PARA ETINIL ESTRADIOL

Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada
4.20	4.2294
4.20	4.1967
4.20	4.2137
5.60	5.6204
5.60	5.6180
5.60	5.6294
7.00	7.0274
7.00	6.9741
7.00	6.9948
8.40	8.4103
8.40	8.3808
8.40	8.3908
10.50	10.4892
10.50	10.4980
10.50	10.5185

CUADRO No 7. Relación de la cantidades adicionadas recuperadas para la evaluación de la linealidad del método de CLAR para etinil estradiol.

Se obtuvieron a partir de los datos de linealidad para etinil estradiol por CLAR ( Cuadro No 7 ) los siguientes valores estadísticos utilizados para la evaluación de la pendiente y la ordenada al origen. ( ecuaciones 1-7)

Cantidad Adicionada		Cantidad Recuperada	
Media :	7.14	Media :	7.1461
Sx :	2.2636	Sx :	2.2566
Ex :	107.1	Ex :	107.1915
Ex <sup>2</sup> :	836.43	Ex <sup>2</sup> :	837.2926

$$E_{xy} : 71.736$$

$$S_{y/x} : 0.016877$$

$$m : 0.99686$$

$$b : 0.02845$$

$$r : 0.999972$$

$$r^2 : 0.9999944$$

#### EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN

Evaluación de Hipótesis

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

Area de Aceptación

$$-2.1604 < t_{cal}$$

$$t_{cal} < +2.1604$$

A partir de la ecuación 8 del Anexo, se realiza la evaluación, utilizando el estadígrafo t de student.

$$t \text{ calc} = \frac{0.028450819 - 0}{0.01687066 \sqrt{\frac{836.43}{15} (71.736)}}$$

$$t \text{ calculo} = 1.912041135$$

Por lo tanto:

$$-2.1604 < 1.912041135 < +2.1604$$

De acuerdo al intervalo de aceptación, nuestra  $t$  de calculo está dentro de ella. Podemos considerar que nuestro método de CLAR para la cuantificación de Etilnil estradiol, posee una ordenada semejante al valor de cero.

#### INTERVALO DE CONFIANZA

A través de la ecuación No. 9 del Anexo se calcula.

$$0.0284508 + 2.1604 ( 0.01687706 ) \sqrt{\frac{836.43}{15} (71.736)}$$

$$I. C. = -0.00368958 \quad a \quad 0.06059122$$

#### EVALUACION DE LA PENDIENTE

La evaluación de la pendiente, se realiza a través del estadígrafo  $t$  de student. Utilizando, la ecuación 10 del Anexo.

Evaluación de la Hipótesis

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

Area de Aceptación

$$-2.1604 < t \text{ calc}$$

$$t \text{ calc} < +2.1604$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{(0.9968696 - 1) (2.263625) \sqrt{15 - 1}}{0.016877066}$$

$$t_{\text{calculo}} : - 1.5709$$

Por lo tanto. Si el área de aceptación es de -2.1604 a 2.1604 y nuestro valor de t calculo es de -1.5709. podemos considerar que nuestra pendiente posee un valor semejante a uno.

Los valores que a continuación se presentan, son el resultado; de cada uno de los niveles de la linealidad. para etinil estradiol por CLAR.

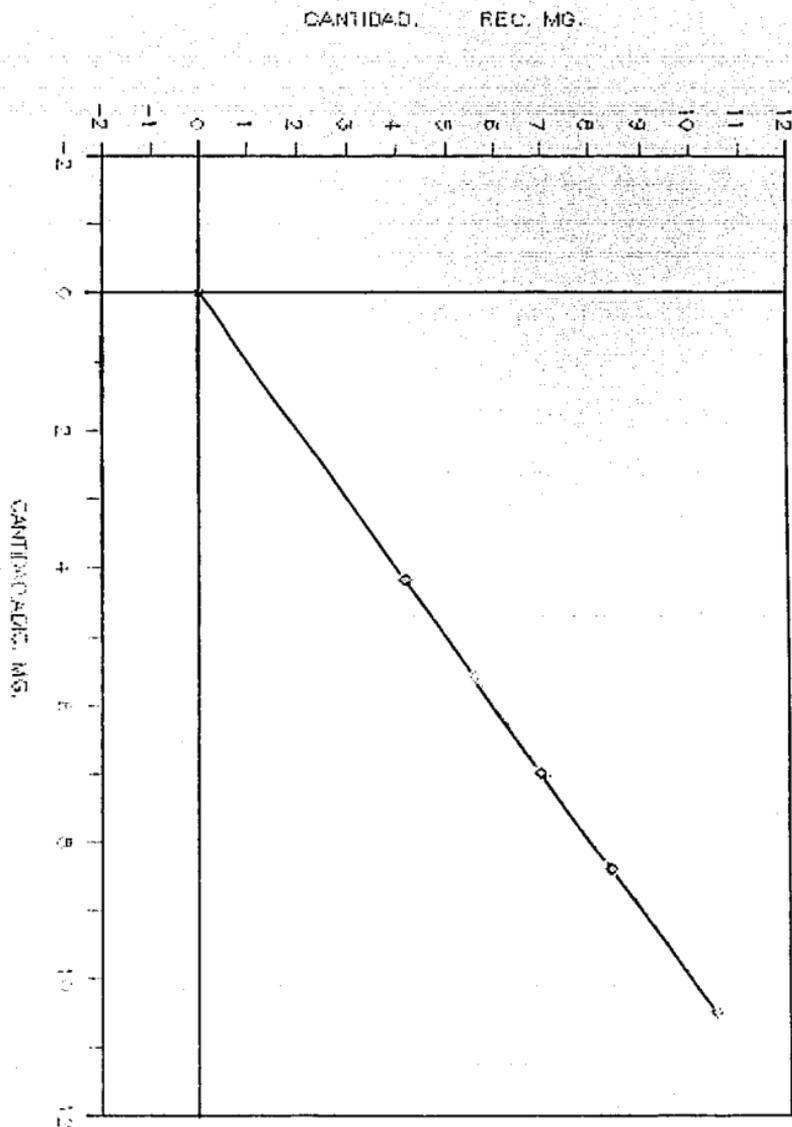
PORCENTAJE PROMEDIO Y C.V DE CADA NIVEL PARA ETINIL ESTRADIOL POR CLAR		
NIVEL	RECOBRO PROMEDIO	C.V %
150 %	100.000	0.157
120 %	99.926	0.178
100 %	99.980	0.384
80 %	100.400	0.105
60 %	100.306	0.214
GLOBAL	100.122	0.210

CUADRO No 8. Los recobros promedio, son el resultado de la suma de la tres replicas de cada nivel dividido entre 3 y el coeficiente de variación ( C.V ), fue obtenido a través de la ecuación No. 7 del anexo.

Los rangos de aceptación para los recobros es de 98 - 102 %, de acuerdo a la tabla VI. Ahora bien para el C.V deben ser menores del 2 %. Al observar el cuadro 7. podemos afirmar que se cumplen con éstos criterios de aceptación para la linealidad.

# LINEALIDAD LIQUIDOS

ETILIL ETANODIOL



#### 4.3.3 COMPARACION ESTADISTICA DE LOS DOS METODOS DE CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL (CLAR Y C.GASES)

Al realizar el estudio estadístico, para determinar si los dos métodos se pueden considerar que poseen una pendiente equivalente entre sí. Utilizando el estadígrafo de contraste t de student.

A través de la ecuación 12 se realizara el calculo.

Prueba de Hipótesis

Area de Aceptación

Ho : M 1 = M 2

t cal < t 0.975 = 2.056

Ha : M 1 ≠ M 2

t cal > t 0.025 = -2.056

g.l ( n-2 ) + ( n - 2 )

$$t_{\text{calc}} = \frac{0.996869633 - 1.0014147}{(0.016877) + (0.97498) \left[ \frac{1}{(36.43) - 764.69} + \frac{1}{1881.9675 - 1720.56} \right]}$$

$$t_{\text{calc}} = -0.451554$$

Area de Aceptación

$$-2.056 < -0.451554 < +2.056$$

Podemos considerar que los dos métodos poseen una pendiente equiparable.

#### 4.4 PRECISION

##### 4.4.1 PRECISION DE NORETINDRONA POR CLAR.

La precisión del método de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión para Noretindrona. Para determinar la reproducibilidad y repetibilidad del método, se realizara una tabla de varianza; la que nos dará las bases para decidir si el método es preciso.

Las determinaciones que se realizarón se encuentran en el CUADRO No. 9.

RESULTADOS DEL ENSAYO DE PRECISION PARA NORETRINDRONA POR CLAR		
	Analista 1	Analista 2
D	100.27	99.84
	1 100.07	100.74
	100.60	100.53
I	99.74	100.17
	2 100.17	99.65
A	99.27	100.94

CUADRO No 9. Se muestran las tres replicas de los ensayos. por dos analista, en dos días diferentes

N = 12  
 Promedio = 100.1658  
 Sx = 0.488625  
 C.V = 0.48781

A continuación se presenta la tabla de ANADEVA , para la evaluación de la precisión, utilizando como referencia la tabla No 1 del Anexo.

-----  
 TABLA DE ANADEVA PARA LA EVALUACION DE LA PRECISION DEL  
 METODO CLAR EN LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA  
 -----

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc	F Tab
Analista ( a )	1	0.3675	0.3675	5.188	38.51
Día ( d )	2	0.14166	0.07083	0.23481	6.06
Error ( e )	8	2.41330	0.30166	=====	====

-----

CUADRO No 10. Resultados del analisis estadístico para la evaluación de la precisión del método CLAR, utilizado en la cuantificación de noretindrona.

#### Interpretación de los resultados

Regla de decisión:

Si  $F_{calc} < F_{tab}$ , el método si es reproducible

Si  $F_{a\ calc} > F_{tab}$ , el método no es reproducible

Como  $F_{a\ calc}$  es 5.188 y la  $F_{tab}$  es de 38.51, por lo que:

$$5.188 < 38.51$$

por lo tanto se considerara al método como reproducible

#### 4.4.2 PRECISION DE NORETINDRONA POR C.GASES

La precisión del método de Cromatografía de Gases, para la cuantificación de noretindrona. se determinara a través de la reproducibilidad y repetibilidad del método. realizandose apartir del ensayo por dos analistas, en dos dias diferentes.

RESULTADOS DEL ENSAYO DE PRECISION PARA NORETINDRONA POR C.GASES		
	Analista 1	Analista 2
D	98.9	99.4
	1 99.9	100.7
	100.3	100.4
I	99.9	99.9
	2 100.4	100.5
A	99.7	100.3

CUADRO No.10. Se muestran las tres replicas de los ensayos. por dos analistas, en dos dias diferentes.

$$N = 12$$

$$\text{Promedio} = 100.025$$

$$Sx = 0.515443$$

Evaluación de la repetibilidad del método CLAR para noretindrona.

Regla de decisión:

Si  $F_d \text{ calc} < F \text{ tab}$ , el método si es reproducible

Si  $F_d \text{ calc} > F \text{ tab}$ , el método no es reproducible

Como  $F_d \text{ calc}$  es igual a 0.23481 y  $F \text{ tab}$  es de 6.06 por lo tanto:

$$0.23481 < 6.06$$

Consideramos que nuestro método de CLAR para la cuantificación de noretindrona es reproducible en distintos días por un mismo analista por lo que es repetible.

De acuerdo a las dos reglas de decisiones antes expuestas, se concluye que nuestro método es preciso.

La tabla de ANADEVA ( Cuadro No 12 ), nos muestra las F calculadas para la evaluación del método cromatografico de gases para la determinación de noretindrona.

TABLA DE ANADEVA PARA LA EVALUACION DE LA PRECISION DEL METODO C.GASES EN LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc	F tab
Analista ( a )	1	0.254992	0.254992	0.9473	38.51
Día ( d )	2	0.538333	0.2691605	1.1724	6.06
Error ( e )	8	1.836667	0.2295833	=====	=====

CUADRO No. 12. En esta tabla de ANADEVA se muestran los resultados de F en la evaluación de precisión en el método de C.Gases para noretindrona.

#### Interpretación de los resultados

Regla de decisión:

Si  $F_{a \text{ calc}} < F_{\text{tab}}$ , el método si es reproducible

Si  $F_{a \text{ calc}} > F_{\text{tab}}$ , el método no es reproducible

Como  $F_{a \text{ calc}}$  es de 0.947339 y  $F_{\text{tab}}$  es de 38.51, por lo que:

$$0.947339 < 38.51$$

podemos considerar que el método de cromatografía de gases para noretindrona es reproducible.

### Evaluación de la repetibilidad del método

#### Regla de decisión:

Si  $F_d \text{ calc} < F_{\text{tab}}$ , el método sí es reproducible

Si  $F_d \text{ calc} > F_{\text{tab}}$ , el método no es reproducible

Como  $F_d \text{ calc}$  es igual a 1.1724132 y  $F_{\text{tab}}$  es de 6.06.  
Por lo tanto tenemos que:

$$1.1724132 < 6.06$$

Con lo que podemos considerar que nuestro método cromatográfico de gases para la cuantificación de noretindrona es reproducible en distintos días por un mismo analista, en otras palabras es repetible.

Al cumplir nuestro método en repetibilidad y reproducibilidad podemos concluir que también es preciso.

4.4.3 COMPARACION ESTADISTICA DE LOS DOS METODOS  
DE CUANTIFICACION DE NORETIDRONA A TRAVES DE  
LA PRECISION

Para determinar si los dos métodos cromatográficos en la cuantificación de noretindrona son equivalentes con respecto a su precisión. Se realizó una prueba de F, utilizando las varianzas muestrales.

COMPARACION DE LA PRECISION DE CLAR Y C. GASES EN LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA		
	C. GASES	CLAR
VARIANZA	0.4886251	0.5154433

Prueba de hipótesis

$$H_0: \sigma^2 = \sigma^2$$

$$H_a: \sigma^2 \neq \sigma^2$$

Estadigrafo de contraste

$$F ( 0.975) \text{ con g.l. } \frac{n-1}{n-1}$$

$$g.l.: (12-1)/(12-1) = 1$$

$$F \text{ de Tablas} = 3.53$$

Ecuación 14 del anexo, para calculo de F.

$$F_p = \frac{S}{S}$$

$$F_p = \frac{( 0.4886251 )}{( 0.5154433 )}$$

$$F_p = 0.898651957$$

Area de Aceptación

$$- 3.53 < F_p < +3.53$$

Como  $F_p$  es igual a 0.898651957. Se considera que los dos métodos poseen una precisión equivalente, a un nivel significativo del 5 %.

## 4.5 PRECISION PARA ETINIL ESTRADIOL

## 4.5.1 PRECISION DE ETINIL ESTRADIOL POR C. GASES

Para llevar a cabo la evaluación estadística de la precisión, se analizarán por triplicado un lote de producción por dos analistas en dos días diferentes para un total de 12 muestras. Los resultados que se obtienen se muestran en el cuadro 13.

-----  
 ENSAYO DE PRECISION PARA ETINIL ESTRADIOL  
 POR EL METODO DE C. GASES  
 -----

	Analista 1	Analista 2
D	100.21	100.58
1	100.88	100.29
	99.72	99.66
I		
	99.78	100.30
2	100.30	99.83
A	99.52	99.83

-----

CUADRO No 13 . Resultados del porcentaje de recobro por dos analistas en dos días diferentes, utilizando el método de C.Gases en la cuantificación de Etinil estradiol.

N	= 12
Promedio	= 100.126
Sx	= 0.4189454
C.V %	= 0.41841

La siguiente tabla de anadeva ( Cuadro No 13 ), se muestran las F calculadas para la evaluación de la precisión del método C. Gases para la cuantificación de etinil estradiol

-----  
 TABLA DE ANADEVA PARA ETINIL ESTRADIOL  
 POR CROMATOGRAFIA DE GASES  
 -----

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc.	F tab
Analista ( a )	1	0.0408	0.0408	0.3353	38.51
Día ( d )	2	0.24333	0.12166	0.59228	6.06
Error ( e )	8	1.64333	0.20541	=====	=====

-----

CUADRO No. 14. Tabla de anadeva, donde se muestran los valores de las F para evaluar la precisión del método C.Gases para cuantificar etinil estradiol.

Interpretación de los resultados.

Si  $F_a < F_{tab}$ , el método es reproducible

Si  $F_a > F_{tab}$ , el método no es reproducible.

Como  $F_a = 0.3353$  y  $T_{tab} = 38.51$ , entonces :

$$0.3353 < 38.51$$

Con lo que se comprueba que el método analítico es reproducible por los analistas.

### Evaluación de la repetibilidad

Regla de decisión:

Si  $F_d < F_{tab}$ , el método si es reproducible

Si  $F_d > F_{tab}$ , el método no es reproducible

Como  $F_d$  calc es igual a 0.59228 y  $F_{tab}$  es de 6.06. entonces  $0.59228 < 6.06$ , por lo tanto, podemos considerar que el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

## 4.5.2 PRECISION DE ETINIL ESTRADIOL POR CLAR.

Al igual que el método de cromatografía de gases, se analizaron por triplicado placebos cargados, en dos días diferentes por dos analistas, los resultados se muestran en el CUADRO No. 14.

-----  
 VALORES OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE PRECISION  
 PARA ETINIL ESTRADIOL POR CLAR  
 -----

	Analistas 1	Analista 2
D	99.48	99.26
1	99.75	99.88
	100.00	99.50
I		
	99.74	99.48
2	99.12	99.70
A	98.83	99.58

-----

CUADRO No 15. Resultados del porciento de recobro para evaluar la precisión del método de cromatografía de líquidos de alta precisión para etinil estradiol.

N	=	12
Promedio	=	99.5266
Sx	=	0.3308483
C.V %	=	0.3324

Acontinuación se presenta el cuadro 16. donde se presenta la evaluación de F calculo para el método de CLAR para la cuantificación de etinil estradiol.

-----  
 TABLA DE ANADEVA PARA ETINIL ESTRADIOL POR  
 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION  
 -----

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc	F tablas
Analista ( a )	1	0.0192	0.0192	0.0964	38.51
Día ( d )	2	0.39833	0.19916	2.034	6.06
Error ( e )	8	0.78333	0.09791	====	====

-----

CUADRO No 16. tabla de ANADEVA donde se observan los resultados para F en la evaluación de etinil estradiol por CLAR.

## Evaluación de la Reproducibilidad.

criterio de aceptación:

- Si  $F_a < F_{tab}$ , El método es reproducible por los analistas.
- Si  $F_a > F_{tab}$ , El método no es reproducible por los analistas

Como se observa en el cuadro, el valor de F de calculo para la  $F_a$  es de 0.0964 y el valor de F de tablas es igual a 38.51; por lo tanto  $0.0964 < 38.51$ , podemos considerar que nuestro método es reproducible entre los analistas

## Evaluación de la repetibilidad

criterio de aceptación:

- Si  $F_d < F_{tab}$ . El método es reproducible en distintos días por un mismo analista
- Si  $F_d > F_{tab}$ . El método no es reproducible en distintos días por un mismo analista

$$F_d = 2.134 \quad \text{y} \quad F_{tablas} = 6.06$$

Como podemos observar, F de calculo para el día ( $F_d$ ) es 2.034 y F de tablas 6.06, por lo que  $2.034 < 6.06$ . Podemos considerar que nuestro método es reproducible en distintos días por un mismo analista ( es repetible ).

4.5.3 COMPARACION ESTADISTICA DE CLAR Y C. GASES  
 PARA LA CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL.

Acontinuación se presenta la comparación estadística, entre cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta presión; para la cuantificación de etinil estradiol, utilizando la prueba de F.

-----  
 COMPARACION DE LOS METODOS CLAR Y C.GASES A TRAVES DE LA  
 PRECISION, EN LA CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL.  
 -----

	C. GASES	CLAR
VARIANZA	0.4189454	0.330848

Prueba de Hipótesis

Estadígrafo de contraste

$$\begin{array}{l}
 H_0: = \\
 H_a: /
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{l}
 F(0.975) \text{ con g.l. } \frac{n-1}{n-1} \\
 g.l = 11-1 / 11-1 = 1 \\
 F \text{ tablas} = 3.53
 \end{array}$$

La F de problema ( Fp ) se calcula utilizando la ecuación 14 del anexo.

$$F_p = \frac{0.41889454}{0.33084803} = 1.603453$$

criterio de aceptación

$$-3.53 < F \text{ problema} < +3.53$$

Como:

$$-3.53 < F_p = 1.603453 < +3.53$$

Podemos concluir, que a un nivel significación del 5%, se acepta la hipótesis nula. Entonces se considera que las varianzas poblacionales de los métodos son equivalentes entre si. Y por consiguiente en cuanto a precisión.

## 4.6 EXACTITUD

4.6.1 EXACTITUD DEL METODO DE CROMATOGRAFIA DE  
GASES PARA LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA  
Y ETINIL ESTRADIOL.

Para realizar el ensayo de exactitud, se prepararon once muestras, de donde se obtuvieron los porcentos de recobro, y con ellos evaluarlo a través del estadigrafo t de student.

-----  
PORCIENTOS DE RECOBRO A TRAVES DE LA CUANTIFICACION  
DE NORETINDRONA Y ETINIL ESTRADIOL POR C.GASES  
-----

Muestra	% recuperado de noretindrona	% recuperado de etinil estradiol
1	99.95	100.06
2	99.92	99.80
3	100.40	100.40
4	100.60	100.37
5	99.76	100.08
6	99.20	99.95
7	99.30	99.70
8	99.80	100.90
9	99.80	100.60
10	100.70	100.20
11	100.06	100.80

-----  
CUADRO No 17. Resultados de recobro para el método de cromatografía de gases para la determinación de etinil estradiol y noretindrona.

Con los resultados del Cuadro No 17, se calcularon los siguientes datos:

NORETINDRONA		ETINIL ESTRADIOL	
Media :	99.95%	Media :	100.26%
Ex :	1099.49	Ex :	1102.86
Ex'' :	109900.29	Ex'' :	110574.29
Sx :	0.4539182	Sx :	0.3931666
CV% :	0.4539%	CV% :	0.392%

El calculo de la Media, desviación estándar (Sx) y coeficiente de variación (CV%), se realizaron de acuerdo a las formulas del anexo ( 5,6,7 )

Evaluación de la exactitud para el método de Cromatografía de gases en la cuantificación de noretindrona, usando el modelo probabilístico de t de student, al igual que el etinil estradiol.

#### EVALUACION DE LA EXACTITUD PARA C. GASES EN LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA

Estadigrafo de contraste

$$H_0 : M = 100\%$$

$$H_a : M \neq 100\%$$

Para evaluar este parámetro se uso la ecuación 15 de anexo.

$$t \text{ calc} = \frac{\bar{X} \% - M}{Sx \% / \sqrt{n}} = \frac{99.95\% - 100}{0.4539182 / \sqrt{11}} = 0.348331$$

## Criterio de aceptación

Si  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}} (n-2, 0.975)$ , no se rechaza  $H_0$ .

Si  $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}} (n-2, 0.975)$ , se rechaza  $H_0$ .

$$t_{\text{tab}} (n-2, 0.975) = 2.2281$$

Como  $0,348331 < 2.2281$ , no se rechaza  $H_0$  y podemos decir que nuestro método tiene una exactitud con un 100% .

IC = Intervalo de confianza del porciento de recuperado.

Ecuación 16.

$$IC = \bar{X} + T_{1-\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$IC = 99.95\% + (2.2281) \frac{0.4539182}{\sqrt{11}}$$

IC = 99.63 a 100.269 del porciento recuperado.

## EVALUACION DE LA EXACTITUD PARA C. GASES EN

## LA CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL

## Estadigrafo de contraste

$H_0 : M = 100\%$

$H_a : M \neq 100\%$

Ecuación 15.

$$t \text{ calc} = \frac{100.26\% - 100\%}{0.39316 / \sqrt{11}} = \frac{0.26}{0.1758608} = 2.193274$$

Criterio de aceptación

Si  $t \text{ calc} < t \text{ tab} (n-2, 0.975)$ , no se rechaza  $H_0$ .

Si  $t \text{ calc} > t \text{ tab} (n-2, 0.975)$ , se rechaza  $H_0$ .

$$t \text{ tab} (n-2, 0.975) = 2.2281$$

Como  $2.193274 < 2.2281$ , no se rechaza  $H_0$  y podemos considerar que nuestro método tiene una exactitud con un 100% en la cuantificación de etinil estradiol.

IC = Intervalo de confianza del porciento recuperado

Empleando la ecuación 16 del anexo.

$$IC = 100.26 + (2.2281) \frac{0.3931666}{11}$$

IC = 99.989 a 100.53 del porciento recuperado.

**4.6.2 EXACTITUD DEL METODO DE CROMATOGRAFIA DE CLAR  
PARA LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA Y  
ETINIL ESTRADIOL**

La exactitud del método de cromatografía de líquidos de alta presión, se evaluará a través de los datos obtenidos de diez muestras, respecto a los porcentajes de recobro para cada principio activo y serán sometidos al modelo probabilístico de t de student.

-----  
PORCIENTO DE RECOBRO OBTENIDOS A TRAVES DE LA CUANTIFICACION  
DE NORETINDRONA Y ETINIL ESTRADIOL POR CLAR  
-----

Muestras	% de Recobro para Noretindrona	% de Recobro para Etinil estradiol.
1	100.07	99.17
2	100.24	100.71
3	99.93	98.90
4	99.51	100.58
5	100.09	99.73
6	100.63	100.51
7	99.47	100.04
8	99.87	99.93
9	99.31	99.59
10	100.57	100.09

CUADRO No 18 . Exactitud para el método de cromatografía de líquidos de alta presión, para determinar noretindrona y etinil estradiol.

Con los resultados del Cuadro No. 18, se calcularón los datos siguientes.

NORETINDRONA		ETINIL ESTRADIOL	
Media	: 99.969	Media	: 99.925
Sx	: 0.424463	Sx	: 0.565583
Ex	: 999.69	Ex	: 999.25
Ex <sup>2</sup>	: 99939.8	Ex <sup>2</sup>	: 99853.25
CV %	: 0.424463	CV %	: 0.5966

Ecuaciones del anexo 5,6,7.

#### EVALUACION DE LA EXACTITUD PARA NORETINDRONA

##### Estadigrafo de contraste

$$H_0 : M = 100\%$$

$$H_a : M \neq 100\%$$

Ecuación 15.

$$t \text{ calc} = \frac{99.969 - 100}{0.424463} = -0.2191$$

##### Criterio de aceptación

Si  $t \text{ calc} < t \text{ tab} (n-2, 0.975)$ , no se rechaza  $H_0$ .

Si  $t \text{ calc} > y \text{ tab} (n-2, 0.975)$ , se rechaza  $H_0$ .

$$t \text{ tab } ( n-2, 0.975 ) = 2.2281$$

como

$$t \text{ calc } = -0.2191 < 2.2281$$

No se rechaza la hipótesis  $H_0$ . y podemos decir que nuestro método posee una exactitud con un valor al 100%

IC= Intervalo de confianza del porciento de recobro.

Ecuación 16.

$$IC = 99.969\% + ( 2.2281 ) \frac{0.424463}{10}$$

IC = 99.379 a 100.01 % del porciento recuperado.

#### EVALUACION DE LA EXACTITUD PARA ETINIL ESTRADIOL

Estadigrafo de contraste

$$H_0 : M = 100\%$$

$$H_a : M \neq 100\%$$

Ecuación 15

$$t \text{ calc } = \frac{99.925 - 100}{0.565583 / \sqrt{10}} = -0.3978$$

### Criterio de Aceptación

Si  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}} (n-2, 0.975)$ . No se rechaza  $H_0$ .

Si  $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}} (n-2, 0.975)$ . Se rechaza  $H_0$ .

$$t_{\text{tab}} (n-2, 0.975) = 2.2281$$

Como  $t_{\text{calc}}$  es  $-0.3978$  y  $t_{\text{tab}} = 2.2281$ , no se rechaza la hipótesis  $H_0$ . y podemos considerar que nuestro método tiene una exactitud con un 100%.

IC = Intervalo de confianza del porciento de recobro

Ecuación 16.

$$IC = 99.925 + (2.2281) \frac{0.565583}{10}$$

IC = 99.498 a 100.35 del porciento de recobro.

**4.6.3 COMPARACION DE LA EXACTITUD PARA LA  
CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL  
POR CLAR Y C. GASES**

Para conocer si los dos métodos son equivalentes en cuanto a exactitud, se realizara a través de la prueba de t, al utilizar los datos obtenidos de la prueba de exactitud de cada método. Al enfrentarlos con el estadígrafo t, nos indicara si existen diferencias significativas entre las medias de las dos poblaciones.

-----  
COMPARACION DE LA EXACTITUD EN LA CUANTIFICACION DE  
ETINIL ESTRADIOL  
-----

	CLAR	C. GASES
Media	99.925	99.95
Sx	0.5961776	0.4539182
n	10	11

-----

Prueba de Hipótesis

Ho: M1 = M2

Ha: M1 ≠ M2

Estadígrafo de contraste

$$t \text{ calc} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Ecuación 17 del anexo

Sp = Estimador de la desviación estándar. Ecuación 18.

$$Sp = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$Sp = \frac{(10-1)(0.591776) + (11-1)(0.4539182)}{10 + 11 - 2}$$

$$Sp = 0.72201401$$

$$t_{cal} = \frac{99.925 - 99.95}{0.72201 \sqrt{\frac{1}{10} + \frac{1}{11}}} = -0.07924668$$

t de tablas con g.l ( n1 + n2 - 2 )

$$t(0.975) = 2.073$$

$$t(0.025) = -2.073$$

Area de Aceptación

$$-2.073 < -0.7924668 < 2.073$$

Se considera que los métodos tienen una exactitud equivalente.

## Intervalo de Confianza

Ecuación 19.

$$( X1 - X2 ) + t_{1 - \alpha/2} \left[ \frac{S1}{n1} + \frac{S2}{n2} \right]$$

$$( 99.925 - 99.95 ) + \frac{0.596177}{10} + \frac{0.453918}{11}$$

$$IC = -0.68978 \quad a \quad 0.63978$$

4.6.4 COMPARACION DE LA EXACTITUD PARA LA  
 CUANTIFICACION DE NORETINDRONA POR  
 CLAR Y C. GASES

Para determinar si los dos métodos de cuantificación para noretindrona son equivalentes en cuanto a exactitud, se realizara una prueba de t, al utilizar los datos obtenidos de la prueba de exactitud de cada método. Al enfrentarlos con el estadigrafo t, nos indicara si existe diferencia significativa entre las medias de las dos poblaciones

-----  
 COMPARACION DE LA EXACTITUD EN LA CUANTIFICACION DE  
 NORETINDRONA  
 -----

	CLAR	C. GASES
Media	99.96	100.26
Sx	0.44742	0.393166
n	10	11

-----

Prueba de Hipótesis

Estadigrafo de contraste

Ho:  $M1 = M2$

t tab (0.975) g.l.(n1 + n2 -2 )

Ho:  $M1 \neq M2$

Ecuación 17 de anexo.

Sp = Estimador de la desviación estándar. Ecuación 18. anexo

$$Sp = \sqrt{\frac{(10 - 1)(0.44742) + (11 - 1)(0.3931666)}{10 + 11 - 2}}$$

$$Sp = 0.64719825$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{99.969 - 100.26}{\frac{0.6471982}{\sqrt{10}} + \frac{0.6471982}{\sqrt{11}}} = -1.02906$$

t tablas con ( n1 + n2 - 2 ) grados de libertad

$$t ( 0.975 ) = 2.073 \quad t ( 0.025 ) = -2.073$$

Area de Aceptación

$$- 2.073 < -1.02906 < 2.073$$

Por lo tanto se considera que los métodos poseen una exactitud equivalente.

Intervalo de confianza

Ecuación 19.

$$IC = ( 99.969 - 100.26 ) + 2.093 \left[ \frac{0.44742}{\sqrt{10}} + \frac{0.39316}{\sqrt{11}} \right]$$

$$IC = -0.8847794 \text{ a } 0.3027794$$

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS A TRAVES DE  
 LA CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLES	C.GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
<b>LINEALIDAD</b>			
m	1.001444	0.99686	m = 1
b	-0-001787	0.02845	b = 0
r	0.999970	0.99997	r = 0.98
r	0.999941	0.99994	r = 0.98
<b>Niveles</b>			
150 %	100.12	100.00	98 - 102%
120 %	100.07	99.92	98 - 102%
100 %	100.46	99.98	98 - 102%
80 %	99.98	100.40	98 - 102%
60 %	100.13	100.30	98 - 102%
Global	100.19	101.12	98 - 102%
<b>CV %</b>			
150 %	0.181	0.1576	< 3 %
120 %	0.168	0.1779	< 3 %
100 %	0.396	0.3836	< 3 %
80 %	0.1432	0.1050	< 3 %
60 %	0.5980	0.3880	< 3 %
Global	0.2730	0.2740	< 3 %

-----  
 CUADRO No.19. Se muestran los resultados obtenidos a través de los recobros en los dos métodos ( CLAR y C:Gases ).

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS A TRAVES DE LA  
 CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLES	C.GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
LINEALIDAD			
S y/x	0.09749	0.1687	< 3%
Prueba de hipótesis ordenada			
Ho: A = 0	t=-0.0947	t=1.912	Si esta dentro del rango de -2.16 a +2.16 posee una ordenada equivalente a cero.
Ha: A = 0			
Prueba de Hipótesis pendiente			
Ho: B = 0	t=0.1842	t=-1.570	Si esta dentro del rango de -2.16 a +2.16 posee una ordenada equivalente a uno.
Ha: B / 0			
Comparación de métodos			
Ho: B1 = B2	t = -0.45155		Si esta dentro del rango de -2.16 a +2.16 posee una pendiente equiparable entre sí.
Ha: B1 / B2			

-----  
 CUADRO No.20. Resultados obtenidos a través del tratamiento estadístico a los recobros en cada uno de los métodos.

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS A TRAVES DE  
 LA CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLE	C.GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
PRECISION			
Media	100.12	99.52	98 - 102 %
CV %	0.4178	0.1099	< 3 %
Reproducibilidad. F calc	F=0.3353	F=0.0964	Si $F_{calc} < F_{tab}=38.51$ es reproducible
Repetibilidad. F calc	F=0.59228	F=2.034	Si $F_{calc} < F_{tab}=6.06$ es repetible
Comparación de métodos			Si $F_{calc} < F_{tab}= 3.53$ son equivalentes entre si
Ho: 1 = 2		F= 1.6034	
Ha: 1 / 2			

-----

CUADRO No. 21 Resultados obtenidos a través de la evaluación de la precisión, por dos analistas en dos diferentes días.

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS A TRAVES DE  
 LA CUANTIFICACION DE ETINIL ESTRADIOL POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLES	C.GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
<b>EXACTITUD</b>			
Media	99.95	99.925	98 - 102 %
CV%	0.4541	0.596	< 3%
Prueba de Hipótesis.			
Ho: E = 100%	t=-.36533	t=-0.3978	Si $-2.2 < t_{cal} < 2.2$ posee una exactitud con un 100%
Ha: E / 100%			
Comparación de los métodos.			
Ho: E1 = E2 dentro		t=-0.07924	Si se encuentra del rango -2.09 a 2.09 tienen una exactitud equiparable entre si.
Ha: E1 / E2			

-----

CUADRO No. 22. Resultados obtenidos a través de la evaluación estadística de los dos métodos ( CLAR y C.Gases) en la cuantificación de etinil estradiol.

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS A TRAVES DE  
 LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLES	C. GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
<b>LINEALIDAD</b>			
m	0.990214	1.00315	m = 1
b	0.014551	-0.02409	b = 0
r	0.999980	0.99992	r = 0.99
r	0.999961	0.99985	r = 0.98
Sy/x	0.025018	-0.744462	Sy/x < 3%
<b>NIVELES</b>			
150%	100.00	100.32	97 - 102%
120%	99.79	99.96	97 - 102%
100%	100.10	99.70	97 - 102%
80%	100.18	99.99	97 - 102%
60%	100.00	100.28	97 - 102%
Global	100.01	100.05	97 - 102%
<b>CV%</b>			
150%	0.450	0.240	< 3%
120%	0.210	0.260	< 3%
100%	0.345	0.228	< 3%
80%	0.196	0.580	< 3%
60%	0.318	0.621	< 3%
Global	0.145	0.621	< 3%

-----  
**CUADRO No.23.** Resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad a través de los recobros de los dos métodos ( CLAR y C:Gases ) en la cuantificación de Noretindrona.  
 -----

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS A TRAVES DE  
 LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLES	C.GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
<b>LINEALIDAD</b>			
Prueba de Hipótesis			
Ho: A = 0	0.6581	-0.7446	Si se encuentra dentro del intervalo
Ha: A / 0 (ordenada)			-2.16 a +2.16 se considera que posee una ordenada equivalente a cero
Prueba de Hipótesis			
Ho: B = 1	-0.01125		Si se encuentra dentro del intervalo
Ha: B / 1 (pendiente)		0.932873	-2.16 a +2.16 posee una pendiente equivalente a uno.
Comparación de métodos por la pendiente			
Ho: B1=B2			Intervalo de confianza -2.056 a +2.056
Ha: B1=B2	0.014639		si se encuentra dentro del I.C, se consideran equiparables entre si.

CUADRO No 24. Resultados obtenidos a través de la evaluación estadística de recobros obtenidos en la cuantificación de noretindrona por CLAR y C.Gases.

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS A TRAVES DE  
 LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLES	C.GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
<b>PRECISION</b>			
Media	100.1658	100.025	98 - 102 %
CV%	0.4878	0.51523	< 3 %
Reproducibilidad.	F=0.9473	F=5.188	F calc < F tab= 38.51 si es reproducible.
Repetibilidad	F=1.1724	F=.2348	Fcal < Ftab = 6.06 se considera como repetible
Comparación de métodos.			
Ho: 1= 2			Si se encuentra dentro del rango de
Ha: 1= 2	0.8986		0.2832 < <3.53 los métodos son equiparables cuanto a precisión

-----

CUADRO No.25 . Resultados obtenidos a través de la evaluación de la precisión de los métodos CLAR y C.Gases en la cuantificación de Noretindrona

-----  
 TABLA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS A TRAVES DE  
 LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA POR CLAR Y C.GASES  
 -----

VARIABLES	C.GASES	CLAR	CRITERIO DE ACEPTACION
<b>EXACTITUD</b>			
Media	100.26	99.969	98 - 102 %
CV%	0.392	0.4475	< 3 %
<b>Prueba de Hipótesis</b>			
Ho: M1=100%	2.1932	0.2191	Si se encuentra dentro del rango de -2.228 a +2.228 se considera como exacto
Ha: M1/100%			
<b>Comparación de los dos métodos</b>			
Ho: M1=M2			Si se encuentre dentro del rango de -2.093 a +2.093 se considera que los métodos son equiparables entre sí.
Ha: M1=M2	-1.0296		

-----  
 CUADRO No.26. Resultados obtenidos al evaluar la exactitud a los dos métodos ( CLAR y C.Gases ) utilizados en la cuantificación de Noretindrona.

## DISCUSION DE RESULTADOS

Al observar las tablas de resultados generales (tabla 18 - 25 ), se aprecia los valores experimentales para cada parámetro, así como los criterios de aceptación establecidos para su aprobación. En primer lugar se observa los cuadros para etinil estradiol en donde se observa que para la linealidad, se obtuvo una ordenada al origen de - 0.0071 en C.Gases y de 0.0284 para CLAR, una pendiente de 1.00141 en C.Gases y 0.9968 para CLAR, Así como un error estándar de correlación de 0.9999706 en C.Gases y 0.999972 en CLAR regresión de 0.0974 en C.gases y 0.01687 para CLAR. El promedio global de recobro de la linealidad es de 100.19% en C.Gases y 100.12% para CLAR y por último un coeficiente de variación con valor de 0.273 en C.Gases y 0.214 en CLAR. Con lo que se demostró que el método desarrollado es lineal tanto en Cromatografía de Gases, como en Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.

Con respecto a la precisión, se demostró con el análisis de varianza; que no existe efecto significativo entre analista ni entre los días.

En cuanto a Exactitud, se comprobó que los dos métodos son exactos en cuanto a la cuantificación de etinil estradiol; ya que al ser comparados con el estadígrafo de t de student, se encuentra dentro del área de aceptación.

La especificidad entre excipientes, es buena, ya que no existe interferencia.

Por último, referente a la evaluación de los parámetros estadísticos para la validación, de los métodos analíticos. se realizó una comparación entre cromatografía de Gases y CLAR.

Al evaluar la linealidad se realizó a través del estadígrafo t de student, donde se obtuvo un valor de -0.4515 y el rango de aceptación es de -2.056 a 2.056; con lo que se demuestra que los métodos ( CLAR y C:Gases) para la cuantificación de etinil estradiol, poseen una linealidad equivalente entre si

Para la precisión, se calculo con el estadígrafo F, donde se obtuvo un valor de 1.6034 y el rango de aceptación es de 0.2832 a 3.53, por lo que podemos afirmar que nuestro dos método son equiparables en cuanto a precisión en la cuantificación de etinil estradiol.

Y en cuanto a exactitud se obtuvo una t de student de -0.0792 y el rango de aceptación es de -2.093 a +2.093, con lo que comprueba que tienen una exactitud equiparable entre sí.

Para la evaluación de los parámetros estadísticos de noretindrona se siguieron de misma manera que en etinil estradiol.

Linealidad de los dos métodos en la cuantificación de noretindrona. respecto a la evaluación de la ordenada al origen se obtuvieron valores de 0.01455 en C.Gases y -0.024 en CLAR, una pendiente de 0.99021 en C.Gases y 1.003153 para CLAR, Así como un coeficiente de correlación de 0.999961 en C.Gases y 0.99985 en CLAR, los valores del promedio global de recobro de la linealidad es de 100.01% en C.Gases y 100.05% para CLAR y por último los resultados del coeficiente de variación son de 0.145% y 0.253% respectivamente. Con lo que se demostro que los métodos desarrollados son lineales tanto en la cuantificación de noretindrona, como de etinil estradiol.

La precisión de los dos métodos en la cuantificación de noretindrona, al ser analizados a través de la tabla de anadeva. se comprobo que no existe efecto entre analista, así como entre días de análisis, con lo que los dos métodos pasa esta prueba.

Al evaluar la exactitud de los métodos, a través del estadígrafo t de student, se encontrarón valores dentro del área de aceptación con lo cual los dos métodos son exactos al cuantificar noretindrona.

La Especificidad de los métodos, en cuanto a excipientes y principios activos, es buena en los dos métodos ya que no se observan interferencia.

Referente a la comparación estadística de los dos métodos, se encontraron los siguientes resultados.

Linealidad: el valor de  $t$  de calculo es de  $-0.01465$ , el cual se encuentra dentro del área de aceptación, que es de  $-2.056$  a  $+2.056$ . Con lo que podemos decir que los dos métodos tienen una linealidad equivalente.

Exactitud: el valor encontrado al realizar el análisis estadístico fue de  $-1.02924$  y el área de aceptación es de  $-2.093$  a  $+2.093$ . con lo que se comprueba que los dos métodos son equivalentes entre sí.

Precisión: Al evaluar la  $F$  de calculo de los dos métodos se encontró que es igual a  $0.8986$  y el rango de aceptación es de  $0.2832$  a  $3.53$ . los dos métodos son equiparables en cuanto a precisión en la cuantificación de noretidrona.

## CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo, en donde se evaluaron dos métodos analíticos ( Cromatografía de Gases y Cromatografía de Líquidos de Alta Presión ) para la separación y cuantificación de noretindrona y etinil estradiol, tanto en granulado como en su presentación farmacéutica de tabletas. Podemos afirmar que los objetivos establecidos se cumplieron satisfactoriamente, ya que se logro que los dos métodos tuvieran una buena resolución y eficiencia para la cuantificación de los dos principios activos( noretindrona y etinil estradiol ) en una sola corrida, debido a que permite un ahorro de tiempo en la cuantificación de estos.

Al evaluar los métodos analíticos de acuerdo a los parámetros establecidos para una validación, se comprobó que los dos métodos analíticos son confiables para la separación y cuantificación de noretindrona y etinil estradiol. Así mismo, cuando se realizó la comparación estadística de los dos métodos, para cada uno de los principios activos, donde se demostro que son equivalentes entre sí.

Por todo lo anteriormente expuesto, solo nos resta decir; que los dos métodos cumplen con todos los requerimientos para ser usados como métodos de rutina indistintamente para la cuantificación de noretindrona y etinil estradiol, ya sea como producto a granel ó producto terminado.

## BIBLIOGRAFIA

1. LOEBL G.S. MANUAL DE FARMACOLOGIA Ed.Orientación. México 1990 pp: 501 - 511.
2. GOODMAN AND GILMAN LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA Ed. Panamericana. Buenos Aires 1986 7 Edición pp: 1340-1346.
3. FARMACOPEA INTERNACIONAL Tercera Edición. Organización Mundial de la Salud. Ginebra 1983 pp:134,224
4. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 5 Edición. Secretaria de Salud, México 1988.
5. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, XXII and NATIONAL FORMULARY XVI Th. Ed. United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A.
6. RODRIGUEZ C.R. VADEMECUM ACADEMICO DE MEDICAMENTOS Tomo I y II Editado por la Dirección General de Publicaciones de la UNAM. 1984
7. RUIZ. M. " EXPERIENCIA CONTINUADA CON EL EMPLEO DE LA COMBINACION NORETINDRONA - ETINIL ESTRADIOL A DOSIS BAJAS COMO ANTICONCEPTIVO" Gineco. Obstetricia México. Vol. 41 año XXXII No. 24 febrero 1977 pp: 179 - 184.
8. RUIZ. M. "RESULTADOS DEL USO DE UNA MEZCLA ESTROGENO - PROGESTAGENO A DOSIS BAJAS, COMO ANTICONCEPTIVO " Gineco. Ostetricia México Vol. 34 Año XXVIII No. 201 julio 1973 pp: 35 - 42.
9. MORIGI E.M. " CLINICAL EXPERIENCE WITH A LOW DOSE ORAL CONTRACEPTIVE CONTAINIG NORETHISTERONE AND ETHINYL OESTRADIOL". Current Medical Research and Opinion Vol. 5 No. 8 1978 pp: 655 - 662.

10. MICHAEL B. " A RANDOMIZED STUDY OF METABOLIC EFFECTS OF FOUR LOW ESTROGEN ORAL CONTRACEPTIVES: I Results after 6 cycles " Contraception May 1981 Vol. 23 No.5 pp: 463-471.
11. JAMES M.D. " EXPERIENCES WITH THE NEW ORAL CONTRACEPTIVE OVYSMEN " The Journal Of International medical Research No.8 1980 pp: 86-89
12. SUBIR R. " COMPARISON OF METABOLIC AND CLINICAL EFFECTS OF FOUR ORAL CONTRACEPTIVE FORMULATIONS AND A CONTRACEPTIVE VAGINAL RING " American Journal Obstetric gynecol. Vol. 136 April 1 1980 No. 7 pp: 920 - 930.
13. ORIZA S.J. GUIA PROFESIONAL DE MEDICAMENTOS Ed. El manual moderno 1897 capitulo 52.
14. CURSO DE INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION. Perkin - Elmer de México julio 1989.
15. RENERIA S. COMPARACION ESTADISTICA DE DOS METODOS ANALITICOS PARA LA SEPARACION DE IODOCLOROHIDROXIQUILONEINA EN UN POLIFARMACO DE USO TOPICO Tesis UNAM ( ENEP-ZARAGOZA) 1985.
16. Mc NAIR M.H. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION Monografía No. 10 Secretaria general de la organización de los estados americanos. Washington D.C Segunda Edición 1980.
17. McNAIR M. H. CROMATOGRAFIA DE GASES Monografía No.23 Secretaria general de la organización de los estados americanos. Washington D.C. 1981
18. CURSO DE FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFIA DE GASES E INTEGRACION CROMATOGRAFICA. Hewlett - Packard 1990.
19. STORCHA J.M. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFIA DE GASES Ed.Alambra España 1975 pp: 1-15

20. GROB C.R. MODERN PRACTICE OF GAS CHROMATOGRAPHY  
Ed. John Wiley & Sons. New York 1977 pp: 1- 112
21. CORDER J.R PHYSICOCHEMICAL MEASUREMENT BY GAS  
CHROMATOGRAPHY John Wiley & Sons Great Britain 1979  
pp:1-31
22. SNYDER J.J. INTRODUCTION TO MODERN LIQUID  
CHROMATOGRAPHY Wiley Interscience publication John Wiley  
& Sons U.S.A 1979 Capitulo I y II.
23. WILLARD H.H. INSTRUMENTAL METHODS OF ANALYSIS  
Ed. Wadsworth publishing company Belmont California 7 Ed.  
1988 pp: 354 - 368
24. MANUAL DE LABORATORIO DE CIENCIA BASICA I. ENEP-ZARAGOZA  
1982.
25. GUERRA J. VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS BY FDA  
LABORATORIES Pharmaceutical Technology March 1986  
pp: 74-76
26. METODOS ANALITICOS " VALIDACION " Comité de elaboración  
de guías oficiales de validación de la dirección general  
de control de insumos para la salud S.S.A. 1991
27. BERRY. R. " PRACTICAL PROCESS VALIDATION OF  
PHARMACEUTICAL PRODUCTS " Drug Cosmetic Ind. Vol. 139  
No.3 pp: 36 - 49
28. Método F - 2002 " DETERMINACION DE NORETINDRONA - ETINIL  
ESTRADIOL POR CROMATOGRAFIA DE GASES" Syntex DIFA México,  
Junio 26 1987
29. Método F-2023 " DETERMINACION DE NORETINDRONA - ETINIL  
ESTRADIOL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION "  
Syntex DIFA México julio 28 1988.

FORMULAS UTILIZADAS PARA EL ANALISIS ESTADISTICO

1. Pendiente de la recta de regresión ( m )

$$m = \frac{N ( \sum XY ) - E ( X ) ( \sum Y )}{N \sum X^2 - ( \sum X )^2}$$

2. Ordenada

$$b = \frac{( \sum Y ) ( \sum X^2 ) - \sum X ( \sum XY )}{N \sum X^2 - ( \sum X )^2}$$

3. Coeficiente de Correlación

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - N \bar{X} \bar{Y}}{(\sum X_i^2 - n \bar{X}^2) (\sum Y_i^2 - n \bar{Y}^2)}$$

4. Error tipico de Estimación  $S_{y/x}$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum Y^2 - a \sum Y - b \sum XY}{N - 2}}$$

5. Desviación Estandar Muestral (  $S_x$  )

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n ( X_i - \bar{X} )^2}{n - 2}}$$

6. Media  $\bar{X}$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{N}$$

7. Coeficiente de variación ( CV )

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

8. t calculo ( evaluación de la ordenada )

$$t_{\text{calc}} = \frac{b - B}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n} - \frac{(\sum X)^2}{n^2}}}$$

9. Intervalo de Confianza para la ordenada ( b )

$$b \pm t_{1-\alpha/2} (S_{y/x}) \sqrt{\frac{\sum X^2}{n} - \frac{(\sum X)^2}{n^2}}$$

10. Estadígrafo de Contraste para la pendiente ( m )

$$t_{\text{calc}} = \frac{(m - M) S_x \sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$$

11. Intervalo de Confianza para pendiente ( m )

$$m \pm t_{1-\alpha/2} \left( \frac{S_{Y/X}}{S_x \sqrt{n-1}} \right)$$

12. Estadígrafo de contraste para la comparación de la linealidad de dos métodos através de la pendiente.

$$t_{\text{calc}} = \frac{B_1 - B_2}{S_{Y/X1} + S_{Y/X2} \sqrt{\frac{1}{EX1^2} + \frac{1}{EX2^2}}}$$

$\frac{1}{EX1^2} \quad n1$        $\frac{1}{EX2^2} \quad n2$

13. Tabla I. Tabla de analisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F tab
Analita	gl = a-1	SCa	MCa = $\frac{SCa}{gla}$	Fa = $\frac{MCa}{Mcd}$	Fga/gld
Dia	gl=(d-1)a	SCd	Mcd = $\frac{SCd}{gld}$	Fd = $\frac{Mcd}{Mce}$	Fga/gle
Error	gle=(r-1)ad	Sce	Mce = $\frac{Sce}{gle}$	=====	=====

14. Estadígrafo de contraste para la comparación de precisión

$$F \text{ calc} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

15. Evaluación de la Exactitud

$$t \text{ calc} = \frac{\bar{X} - 100}{S_x / \sqrt{n}}$$

16. Intervalo de confianza para la Exactitud

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

17. Estadígrafo para la comparación de la exactitud

$$t \text{ calc} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

18. Estimados de la desviación estándar (Sp)

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1-1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

19. Intervalo de confianza para la comparación de la exactitud

$$(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) \pm t_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{S_1}{n_1} + \frac{S_2}{n_2}}$$