

9  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO  
ESPECTROFOTOMETRICO PARA TABLETAS DE  
CLORHIDRATO DE CLORDIAZEPOXIDO"

T E S I S

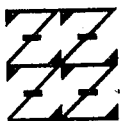
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JOSE LUIS BRAVO GARCIA

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO, OJO  
DE NUESTRA REFLEXION

México, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

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

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

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

## INDICE

	pág.
I. INTRODUCCIÓN. ....	6
II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA. ....	8
A. Validación .....	8
1. Definición de Validación .....	8
2. Definición de los Parámetros de Validación ....	11
a. Linealidad .....	11
b. Exactitud .....	11
c. Precisión .....	11
1) Repetibilidad .....	12
2) Reproducibilidad .....	12
d. Especificidad .....	12
e. Estabilidad de la muestra .....	12
3. Determinaciones .....	13
a. Linealidad del sistema .....	13
b. Precisión del sistema .....	13
c. Linealidad del método .....	13
d. Exactitud del método al 100% .....	14
e. Precisión de método .....	14
1) Repetibilidad .....	14
2) Reproducibilidad .....	14
f. Especificidad para método de control de calidad .....	14
g. Estabilidad de la muestra .....	15

B. Espectrofotometría .....	16
1. Interacción Entre la Materia y la Energía	
Radiante .....	16
2. Ley de Lambert y Beer .....	17
3. Espectrofotómetro .....	19
C. Tabletas .....	22
1. Excipientes .....	23
a. Diluyentes .....	23
b. Cohesivos .....	23
c. Lubricantes .....	23
d. Deslizantes .....	24
e. Desintegrantes .....	24
f. Agentes colorantes .....	25
g. Edulcorantes .....	25
D. Clorhidrato de Clordiazepóxido .....	27
1. Propiedades .....	27
a. Descripción .....	27
b. Espectro Ultravioleta .....	29
2. Farmacología .....	30
a. Antecedentes y Uso Terapéutico .....	30
b. Absorción, Destino y Excreción .....	30
c. Presentación y Dosis .....	33
d. Efectos Secundarios .....	34

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	35
IV. OBJETIVOS. ....	37
A. Objetivo General .....	37
B. Objetivos Particulares .....	37
V. HIPÓTESIS. ....	38
VI. MATERIAL Y MÉTODO. ....	39
A. Material, Reactivos y Equipo .....	39
B. Método Analítico para Cuantificación de Clorhidrato de Clordiazepóxido en Tabletas. ....	41
1. Modificaciones a la Técnica analítica .....	43
a. Muestra .....	43
b. Estándar .....	43
C. Linealidad del Sistema .....	44
D. Precisión del Sistema .....	44
E. Linealidad del Método .....	45
F. Precisión del Método .....	46
1. Repetibilidad .....	46
2. Reproducibilidad .....	46
G. Exactitud del Método .....	47
H. Especificidad del Método .....	47
I. Estabilidad de las Muestras .....	48
VII. RESULTADOS .....	49
A. Linealidad del Sistema .....	49
1. Evaluación con Regresión Lineal .....	49
2. Evaluación Estadística .....	52

a. Analisis de Varianza .....	52
B. Precisión del Sistema .....	53
C. Linealidad del Método .....	54
1. Evaluación con Regresión Lineal .....	54
2. Evaluación Estadística .....	57
a. Pendiente .....	57
b. Intervalo de Confianza .....	58
c. Ordenada al Origen .....	58
d. Análisis de Varianza .....	59
D. Exactitud del Método al 100% .....	61
1. Evaluación a través del Intervalo de Confianza..	44
2. Evaluación con el Estadígrafo de contraste	
"t" de Student .....	63
E. Precisión del Método .....	63
1. Repetibilidad .....	63
a. Evaluación Estadística con el Coeficiente	
de Variación .....	64
b. Evaluación con el Estadígrafo " $\chi^2$ " .....	65
2. Reproducibilidad .....	66
F. Especificidad del Método .....	68
G. Estabilidad de las Muestras .....	69
VIII. DISCUSIÓN .....	71
IX. CONCLUSIONES .....	75
X. ANEXO .....	76
A. Linealidad del Sistema .....	76

B. Precisión del Sistema .....	77
C. Linealidad del Método .....	78
D. Exactitud del Método al 100% .....	81
E. Precisión .....	82
1. Repetibilidad .....	82
2. Reproducibilidad .....	84
F. Estabilidad de las Muestras .....	85
XI. REFERENCIAS .....	87
XII. BIBLIOGRAFIA .....	90

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos que involucran la salud deben contar con un control químico estricto en su elaboración, para el aseguramiento de su calidad. Es por esto que la validación de los métodos analíticos tiene importancia primordial, con la finalidad de tener un control sobre los productos farmacéuticos, y de esta manera cumplir con los requisitos y buenas prácticas que marca la Secretaría de Salud.

La validación se encuentra íntimamente relacionada con el desarrollo y manufactura adecuada de medicamentos en la Industria Farmacéutica. Ya que es un proceso mediante el cual se establece, por estudios experimentales la capacidad del método, para satisfacer los requisitos mínimos necesarios con la aplicación analítica deseada.

El tema de validación involucra el manejo adecuado de las técnicas analíticas, las buenas prácticas de manufactura y el desarrollo de un programa óptimo para asegurar la confiabilidad de los métodos que se utilizan para el control de calidad de los medicamentos. Es por ello que la validación es parte integral del desarrollo de un método analítico, para determinar con esto su efectividad..

Los estudios experimentales que involucra este tema son de vital importancia en la toma de decisiones para la aplicación



correcta de las técnicas analíticas en los laboratorios de control de calidad.

En la presente Tesis dan a conocer conceptos generales de validación, la estructura química y la farmacología del clorhidrato de clordiazepóxido. Así como un programa de validación para tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido, analizando los resultados con diferentes tratamientos estadísticos, para cada parámetro, y con base en ellos asegurar las decisiones.

Al final del trabajo se da un anexo, el cual contiene el soporte estadístico y las fórmulas ocupadas para el análisis de resultados.

## II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

### A. VALIDACIÓN.

Los resultados que se obtienen por medio de un método analítico se encuentran influidos por diferentes factores tales como: el medio ambiente (temperatura y luz), el uso de diferentes reactivos, analistas, laboratorios, equipos, materiales, etc. La validación tiene por objeto evaluar la influencia de todas estas variables en la capacidad del método para medir una propiedad física o química de la muestra en estudio y así emitir un juicio para decidir si el método puede o no ser aplicado a una situación particular. Por medio de la validación se pueden detectar errores. Un método analítico está sujeto a dos tipos de error, el sistemático y el aleatorio. El primero es el que da lugar a medidas incorrectas que pueden ser asignadas a una causa específica, el segundo es aquel que permanece aun cuando se ha eliminado el error sistemático y por lo tanto da lugar a medidas imprecisas. El error total del método será la suma de los errores sistemáticos y aleatorios.

## 1. Definición de Validación

La validación es un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en análisis químico. Es un proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. <sup>(1, 2)</sup>

Existen muchas formas de validar, ya que hay gran variedad de experimentos que pueden ser utilizados para tal fin. El escoger cuales serán los puntos para validar un método depende generalmente de las necesidades de cada laboratorio, de la aplicación que tenga el método y de los requerimientos oficiales. En la tabla 1 se mencionan los parámetros a valorar dependiendo de la aplicación que tendrá el método.

**TABLA 1. Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método.**

PARAMETRO	C. C.	IND. EST.		BIOD.	REV. MET.	
		B. C.	A. C.		SCCO	CCCO
LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA	X	X	X	X	X	X
LIMITE DE DETECCION		X		X		
LIMITE DE CUANTIFICACION		X		X		
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	X	X	X	X	X	X
LINEALIDAD DE METODO	X	X	X	X	X	X
PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)	X	X	X	X		X
ESPECIFICIDAD (C.C.)	X	X	X	X	X	X
ESPECIFICIDAD (ESTABILIDAD)		X	X			
TOLERANCIA DEL SISTEMA		X	X	X		X
ESTABILIDAD DE MUESTRA	X	X	X	X		

Abreviaturas : C. C. = CONTROL DE CALIDAD  
 IND. EST. = INDICADORES DE ESTABILIDAD  
 B. C. = BAJAS CONCENTRACIONES  
 A. C. = ALTAS CONCENTRACIONES  
 BIOD. = BIODISPONIBILIDAD  
 REV. MET. = REVALIDACION DEL METODO  
 SCCO = SIN CAMBIO EN CONDICIONES DE OPERACION  
 CCCO = CON CAMBIO EN CONDICIONES DE OPERACION <sup>(1)</sup>

Puesto que el método espectrofotométrico para tabletas de clornidrato de clordiazepóxido es para utilización en control de calidad se enfoca el estudio en los parámetros de validación que se marcan para tal fin, de acuerdo a la tabla anterior.

## 2. Definición de los Parámetros de Validación

### a. Linealidad

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

### b. Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor real de referencia.

### c. Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una muestra homogénea del producto.

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

2) 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 diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos).

#### d. 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.

#### e. Estabilidad de la Muestra

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. (1, 2, 3)

### 3. Determinaciones

#### a. Linealidad del Sistema

La determinación se lleva a cabo construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida). El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100%.

#### b. Precisión del Sistema

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100%.

#### c. Linealidad del Método

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente haciendo los análisis por triplicado. Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo la correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (Control de calidad, estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

**d. Exactitud del Método al 100%**

Se determina de cuando menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto.

**e. Precisión del Método**

1) Repetibilidad. Analizar 6 muestras preparadas por adición de la sustancia de interés al 80%, 100% y 120% en placebos del producto. Bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

2) Reproducibilidad. Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

**f. Especificidad para Método de Control de Calidad**

Analizar placebos del producto. Identificar la respuesta del activo, y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.



#### 9. Estabilidad de la Muestra

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

## B. ESPECTROFOTOMETRIA

1. Interacción entre la Materia y la Energía Radiante. Las formas de interacción más importantes entre la materia y la energía radiante, desde el punto de vista del químico analítico, son los fenómenos de absorción y de emisión de la energía radiante por la materia. Siempre y cuando un átomo, una molécula o cualquier otra partícula de materia absorba un fotón, esa partícula de materia se vuelve más energética, esto es, la partícula posee más energía de la que poseía antes de la interacción. Y, a la inversa, siempre y cuando una partícula de materia emita un fotón, la partícula queda en un estado menos energético. Estas dos consideraciones fundamentales están subyacentes en todos los métodos analíticos que se basan en la absorción y emisión de energía radiante.<sup>(4)</sup>

Principios. Los cambios en la configuración electrónica y en la energía de las moléculas producen espectros en las regiones ultravioleta y visible del espectro. Estas últimas se definen como la radiación asociada con la absorción en el intervalo de 200 a 800 nanómetros.<sup>(5)</sup>

Se da el nombre de espectrofotometría por absorción de la luz a un método muy general, cuyo principio es el siguiente: Un haz luminoso de longitud de onda determinada atraviesa la solución objeto de análisis, y de la proporción de la intensidad luminosa absorbida por la solución se deduce la concentración de la

sustancia absorbente, al compararla con un estándar o solución de referencia conocida. Es uno de los métodos cuantitativos más importantes para análisis en disolución.

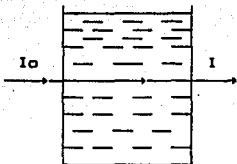
Las principales ventajas del método son:

-Es de un empleo muy general. Si la sustancia a determinar es poco absorbente, se tiene el recurso de añadir un reactivo conveniente que dé un compuesto absorbente.

-Puede alcanzar gran sensibilidad para determinación en trazas y ser extremadamente rápido a consecuencia de su utilización para medidas directas sin adición de solución valorada, y de la facilidad de la medida.<sup>(4)</sup>

-Las mediciones de absorción implican la reducción del poder de radiación que experimenta un haz de radiación, como consecuencia de su paso por un medio absorbente. La longitud de onda a la que se presenta una absorbancia máxima depende de la magnitud de la energía involucrada en una determinada transición electrónica.<sup>(5)</sup>

2. Ley de Lambert y Beer. Supongamos que un haz de luz monocromática atraviesa un espesor  $l$  de solución de una sustancia absorbente. Sea  $I_0$  la intensidad del haz de luz a la entrada de la solución y sea  $I$  su intensidad a la salida (fig 1). Si  $c$  es la concentración de la sustancia absorbente, la ley de Lambert y la de Beer pueden condensarse en una única relación (fórmula 1) :



(fig 1) Representación esquemática de una celda espectrofotométrica atravesada por un haz de luz.

Se define la "transmisión"  $T$  como la relación de las dos intensidades luminosas,  $T = I/I_0$  ; expresado a menudo en porcentaje. La densidad óptica  $D$  (o absorbancia) es el logaritmo de la relación inversa:  $D = \log I_0/I$ .  $l$  se expresa siempre en centímetros. La constante de proporcionalidad  $\epsilon$  se conoce como coeficiente de absorción molar, estando expresada la concentración en moles por litro.  $\epsilon$  depende de la naturaleza de la sustancia absorbente, de la longitud de onda y de la temperatura, siendo en principio independiente del disolvente.

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon lc$$

(fórmula 1) Ley de Lambert y Beer

Esta ley no se cumple más que en condiciones ideales:

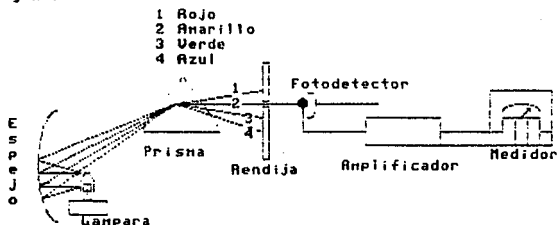
La concentración  $c$  de la sustancia no debe ser muy elevada.  
Concentraciones importantes de sales, en ausencia de reacción

química, influyen a veces de un modo sensible en la absorción. La ley no se cumple en el caso de soluciones fluorescentes o de suspensiones.

3. Espectrofotómetro. Los instrumentos diseñados para la medición de la emisión y la absorción de la energía radiante de sustancias son: fotómetros, espectrómetros y espectrofotómetros.

El espectrofotómetro es un espectrómetro con equipo accesorio que proporciona la relación, o una función de la relación, del poder radiante de dos haces electromagnéticos con respecto a la longitud de onda espectral.

Todos los instrumentos de absorción contienen una fuente de radiación y cada región espectral tiene sus propios requerimientos. Todos los espectrómetros incluyen una forma de detección de las diferentes frecuencias de radiación mediante una dispersión del haz con un prisma o rejilla que produce un espectro de longitudes de onda (Fig 2).



(Fig 2) Diagrama esquemático de un espectrofotómetro

La radiación dispersa incide sobre una superficie que tiene una rendija que se ajusta para que pase a la muestra la línea o banda de emisión deseada. La muestra absorbe una porción de la luz; el resto se transmite a través de la propia muestra e incide en un detector en donde se transforma en una señal eléctrica muy débil que se manda al amplificador. Un medidor indica la cantidad de luz que pasa por la muestra, conociéndose de esta forma la concentración, utilizando muestras adecuadas, como un estándar de referencia.

El espectrofotómetro produce una banda angosta de radiación espectral (llamada radiación monocromática) posteriormente mide el grado de interacción entre esta radiación y una muestra química.

El espectrofotómetro está formado por varios componentes mayores integrados en un solo sistema. Los componentes principales incluyen: la fuente de radiación, el monocromador, el detector, el amplificador y el instrumento de lectura. La unión de los tres últimos forma el sistema fotométrico. Los espectrofotómetros también incluyen un compartimiento para alojar la muestra y se ubica entre el monocromador y el detector. A continuación se darán más detalles de los componentes principales.

El primer componente es la fuente luminosa, debe proveer radiación intensa y estable sobre un rango espectral amplio y con salida comparable para toda longitud de onda. Deben ser de tamaño óptimo, durables y económicas, una lámpara de tungsteno es una

buena fuente de radiación para la región visible, para la región UV, se utiliza comúnmente una lámpara de deuterio o hidrógeno.

El monocromador es un dispositivo que se utiliza para convertir la radiación policromática en una forma monocromática adecuada. El mecanismo de dispersión controla el carácter monocromático de la radiación que incide sobre la muestra, para ello se utilizan los prismas.

En el área de la muestra se colocan las celdas; no deben afectar la radiación por lo que se emplean de material de vidrio para la región visible y de cuarzo en la ultravioleta.

En los espectrofotómetros de UV-VIS se emplean dispositivos electrónicos que se conocen como fototubos y fotomultiplicadores, para detectar la intensidad de radiación transmitida por la muestra. El medidor o registrador; la señal del detector se alimenta con un circuito potenciométrico, que se gradúa para obtener un dato de lectura de trasmittancia o absorbancia. Los espectrofotómetros registradores trazan un registro de la absorbancia sobre papel; con estos instrumentos se traza automáticamente el espectro de absorción completo.

## C. TABLETAS

Los fármacos se administran con mayor frecuencia por vía oral mediante formas farmacéuticas sólidas como las tabletas. Los métodos de producción en gran escala que se usan para su preparación requieren la presencia de otros materiales, además de los componentes activos. También se pueden incluir en la formulación aditivos para mejorar el aspecto físico, la estabilidad y contribuir a la desintegración después de la administración.

Las tabletas se pueden definir como formas farmacéuticas sólidas de dosificación que contienen principios activos junto con diluyentes apropiados que se preparan mediante compresión. Pueden ser redondas, ovaladas, cilíndricas o triangulares. El tamaño y peso varía de acuerdo a la cantidad de fármaco que contienen y el método de administración.

Los aditivos o excipientes que contienen las tabletas se pueden clasificar de acuerdo con la función que cumplen. El primer grupo contiene los materiales que contribuyen a impartir características de procesamiento y compresión adecuadas a la formulación. Estos son: diluyentes, cohesivos, deslizantes y lubricantes. El segundo grupo de sustancias imparten características físicas deseables a la tableta terminada y comprende: desintegrantes y colorantes, en el caso de tabletas masticables, sabores y agentes edulcorantes.



## 1. Excipientes

### a. Diluyentes

Muchas veces la dosis única del constituyente activo es pequeña y se agrega una sustancia inerte para aumentar el volumen, con esto la tableta tendrá un tamaño práctico durante la compresión. Los diluyentes que se usan para este fin comprenden fosfato dicálcico, sulfato de calcio, lactosa, celulosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, almidón seco y azúcar en polvo.

### b. Cohesivos

Los agentes para impartir cohesión al material en polvo aseguran que la tableta se mantenga intacta después de comprimirla y mejoran las cualidades de fluidez mediante la formulación de gránulos de dureza y tamaño que se desean. Los materiales que se suelen usar como cohesivos son: almidón, gelatina y azúcares como sacarosa, glucosa, dextrosa, melaza y lactosa. Entre las gomas naturales y sintéticas que se han utilizado figuran acacia, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etc. Los cohesivos se usan en solución y en forma seca, dependiendo de los otros componentes de la fórmula y el método de preparación.

### c. Lubricantes

Impiden que el material de las tabletas se adhiera a la superficie de las matrices y punzones en la tableteadora, reducen la fricción entre las partículas y pueden mejorar la fluidez de la

granulación. Los lubricantes de uso comun comprenden talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido estearico y aceites vegetales hidrogenados. La mayoría de los lubricantes se usan en concentraciones menores del 1%.

#### d. Deslizantes

Deslizante es toda sustancia que mejora las características de fluidez de una mezcla de polvos. Simpre se agregan antes de la compresión. El dióxido de silicio coloidal y talco se usan por lo general en concentraciones del 1% o menos.

#### e. Desintegrantes

Es toda sustancia o mezcla de sustancias que se añade a una tableta para facilitar su desintegración después de administrarla. El constituyente activo debe liberarse de la matriz de la tableta con la mayor eficiencia posible para permitir su rápida disolución. Los materiales que sirven para este usos se clasifican como almidones , arcillas, celulosa, alginas, gomas y polimeros. El agente desintegrante suele mezclarse con los componentes activos y diluyentes antes de la granulación, en concentraciones del 2 al 15% dependiendo de la formulación.

#### f. Agentes Colorantes

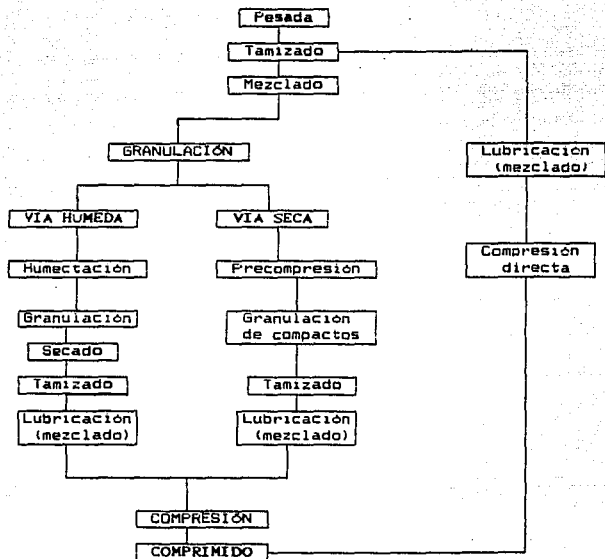
Los colores de las tabletas comprimidas mejoran el aspecto de la forma farmacéutica, ayuda al fabricante a mantener el control del producto durante su preparación y sirve de identificación para el usuario. Los colorantes comprenden rojo número 3, amarillo número 5 y 6, azul número 1 y 2, etc.

#### g. Edulcorantes

Además de la dulzura que puede conferir el diluyente de la tableta masticable, como manitol o lactosa pueden incluirse edulcorantes artificiales, en pequeñas cantidades para no influir sobre las características físicas de la granulación de la tableta.

Las tabletas comprimidas pueden caracterizarse o describirse con una cantidad de especificaciones, como diámetro, forma, espesor, peso, dureza, tiempo de desintegración y características de disolución.

En el siguiente diagrama se dan a conocer los principales métodos de elaboración utilizadas para tabletas, se mencionan las operaciones unitarias necesarias para la correcta fabricación. El método más usado y más general es el de granulación húmeda o vía húmeda. (Diagrama 1). Este procedimiento es el empleado para fabricación de tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido.



(Diagrama 1). Secuencia de operaciones en la elaboración de comprimidos. (7)

## D. CLORHIDRATO DE CLORDIAZEPÓXIDO

### 1. Propiedades

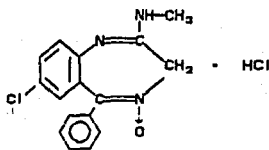
a. Descripción. Clorhidrato de clordiazepóxido es el: 7-cloro-2-(metilamino)-5-fenil-3H-1, 4-benzodiazepin-4-oxi monoclóhidrato.

3H-1, 4-Benzodiazepin-2-amino, 7-cloro-N-metil-5-fenil-4-oxi, monoclóhidrato.

Su fórmula condensada es:  $C_{16}H_{14}Cl N_3 O \cdot HCl$

Su peso molecular es: 336.22 gr/mol

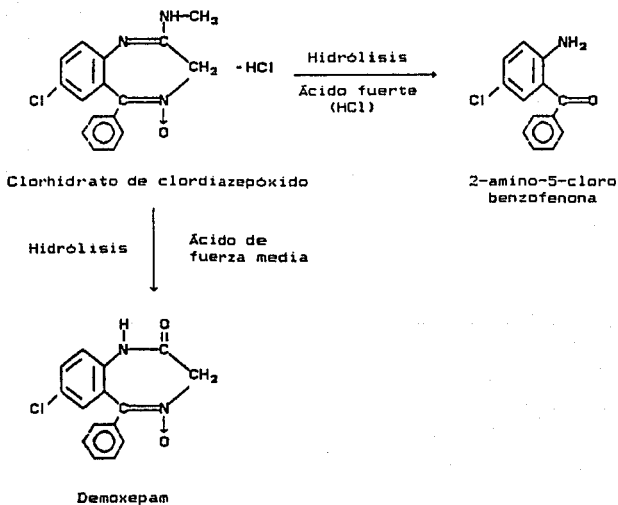
Su fórmula desarrollada es la siguiente (Fig. 3):



(Fig 3) Estructura química del clorhidrato de clordiazepóxido.

Es un polvo blanco o prácticamente blanco, inodoro. Sensible a la luz solar. Soluble en agua y alcohol; insoluble en hexano. Funde con descomposición a  $212-218^{\circ}C$ . (B. 2)

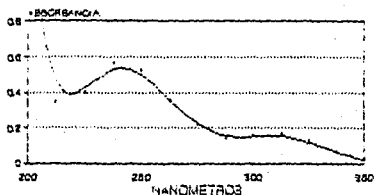
Los productos de degradación del clordiazepóxido en solución acuosa se muestran en la figura 4, la hidrólisis con ácido de fuerza media origina demoxepam, con ácido fuerte el producto es el 2-amino-5-clorobenzofenona.



(Fig 4). Reacciones de degradación del clordiazepóxido.<sup>(40)</sup>

b. Espectro Ultravioleta. El clorhidrato de clordiazepóxido medido entre 360 y 210 nanómetros en alcohol acidificado (0.1N  $H_2SO_4$ ) exhibe máximos de absorción a 245-6nm y 311-12 nm. Observándose mínimos de absorción a 218 y 295-6nm. (Fig 5).

### ESPECTRO ULTRAVIOLETA DEL CLORHIDRATO DE CLORDIAZEPOXIDO



(Fig 5) Espectro ultravioleta de clorhidrato de clordiazepóxido. En alcohol acidificado. Concentración  $(5 \times 10^{-4} \%)$ . (10)

## 2. Farmacología

a. Antecedentes y Uso Terapéutico. En el tratamiento de ansiedad y disforia leve se utilizan agentes químicos como lo son las benzodiazepinas. Compuestos de este tipo se sintetizaron inicialmente en la década de 1930. Siendo la primer benzodiazepina de éxito el clordiazepóxido a fines de la década de 1950, se descubrió que este compuesto tenía propiedades relajantes musculares y bloqueadores de los reflejos espinales. Produjo la "domesticación" de muchas especies animales lo que llevó a ensayos clínicos de la droga en el hombre para determinar sus efectos ansiolíticos.

El clordiazepóxido y el diazepam pueden considerarse drogas prototípicas de su clase. Su uso es amplio como agentes ansiolíticos, teniendo además usos como hipnóticos y anticonvulsivos.<sup>(11)</sup>

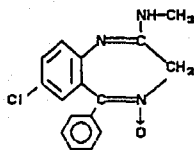
b. Absorción, Destino y Excreción. El clordiazepóxido se absorbe bien después de su administración oral, alcanzando un nivel plasmático máximo en 4 horas.

Las benzodiazepinas se ligan a proteínas plasmáticas. Los volúmenes aparentes de distribución son elevados: 1 a 3 litros por kilogramo.

El clordiazepóxido tiene una vida media de eliminación larga (6 y 30 h). La desmetilación de la cadena lateral de 2-metilamino proporciona un metabolito inicial, el desmetil clordiazepóxido, el

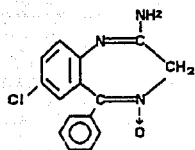


cual experimenta una desaminación oxidativa lenta para dar un derivado 2- cetónico, el demoxepam (Fig 6). Una posterior transformación conduce a otros dos metabolitos activos, el N-desmetil-diazepam y el oxazepam, a través de una nueva hidroxilación de la posición 3. Éste metabolito se conjuga rápidamente con ácido glucurónico y se excreta por la orina.

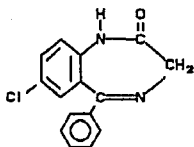


Clorhidrato de clordiazepóxido

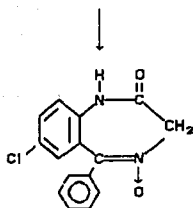
- HCl



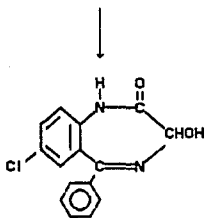
N-desmetilclordiazepóxido



N-desmetildiazepam



Demoxepam



Oxazepam



Conjugación con  
ácido glucurónico



EXCRECIÓN

(Fig 6). Vía metabólica del clorhidrato de clordiazepóxido<sup>(12)</sup>

c. Presentación y Dosis. Se presenta en tabletas de 5, 10 y 25 mg. La dosis es de 15 a 60 mg por día divididas en dos a cuatro porciones las tomas. Para dosis extremas se dan de 10-100mg por día. Para niños de 6 a 12 años el clordiazepóxido puede darse en dosis diarias divididas de 10 a 30 mg.

Para el tratamiento de la ansiedad el clorhidrato de clordiazepóxido se dosifica, de la forma esquematizada en la tabla 2 y 3.

TABLA 2. Dosificación del clorhidrato de clordiazepóxido.

Nombre	Nombre comercial	Formas de dosificación (mg)	Dosis diaria	
			Habitual (mg)**	Extrema (mg)
Clorhidrato de clordiazepóxido	Librium	Tableta 5; 10; 25	15-60	
	Apóxido	Cápsula 5; 10; 25		10-100
	Sklygen	Ampolla 100/2ml	50-100 por dosis	300(IV)

\*\* La dosis diaria se da en miligramos totales por día, dividiendo las tomas en dos o cuatro porciones. Todas las dosis son para adultos o adolescentes.

TABLA 3. Vida media, formas de dosificación y dosis oral para los efectos sedante e hipnótico.

Nombre Químico y Comercial	Vida media (horas)	Formas de dosificación (mg)	Dosis oral en adultos (mg)	
			Sedante	Hipnótica
Clorhidrato de Clordiazepóxido (Librium)	7-28	T: 5, 10, 25	5-10, 2-3d	25
		C: 5, 10, 25	5-20, 3-4d	25

T= tableta. C= capsula d= día. (18)

d. Efectos Secundarios. Los efectos secundarios en los depresores del sistema nervioso central son somnolencia y ataxia (Falta de coordinación en los movimientos) que serian extensiones de las acciones farmacológicas de estas drogas.

Otras reacciones tóxicas producidas por el clordiazepoxido son erupcion cutanea, nauseas, cefalea, deterioro de la función sexual y mareos.<sup>(4)</sup>

La toxicidad clinica de las benzodiazepinas es baja, ya que tienen un margen de seguridad alto.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las necesidades de la industria farmacéutica son las de contar con métodos de análisis adecuados y que se encuentren perfectamente documentados para su buen funcionamiento y se tenga con esto un control de calidad óptimo en la elaboración de los medicamentos.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, ya que el método debe probarse para que cumpla con ciertas características y determinar su exactitud.

Es por ello que se deben de establecer programas de validación adecuados que cumplan con los requisitos que marca la Secretaría de Salud, todo esto para asegurar y hacer confiables los métodos de análisis utilizados para el control de los medicamentos.

Es tarea del Químico Farmacéutico desarrollar este programa encaminado a la correcta aplicación y validación del método analítico, basándose en las disposiciones que establecen los requisitos mínimos para validaciones, de acuerdo a las necesidades de aplicación que exija el método.

Puesto que el método analítico en estudio (Método espectrofotométrico para tabletas de clornidrato de clordiazepóxido) es para utilizarse en control de calidad, en la

validación incluyó la evaluación de los parámetros siguientes:

**A. SISTEMA:**

Linealidad

Precisión

**B. MÉTODO:**

-Linealidad

-Exactitud.

-Precisión:

Repetibilidad.

Reproducibilidad.

-Especificidad.

-Estabilidad de las muestras

Con estos parámetros analíticos se abordó la validación para una eficiente documentación del método.

#### IV. OBJETIVOS

##### A. Objetivo General

Validar el método de análisis espectrofotométrico para tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido, utilizando como medio alcohol acidificado.

##### B. Objetivos Particulares

1. Determinar la linealidad del sistema y la linealidad del método con ayuda de estándar y cinco niveles de concentración del clorhidrato de clordiazepóxido con cinco determinaciones para cada nivel.
2. Determinar la precisión (Repetibilidad) del método a tres niveles de concentración del clorhidrato y la precisión en términos de la reproducibilidad, evaluando el efecto del analista, del día y sus interacciones.
3. Determinar la exactitud al cien por ciento, la especificidad para el mismo método de análisis y la estabilidad de las muestras en las mismas condiciones experimentales.

## V. HIPÓTESIS

Si el método de análisis espectrofotométrico para tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido cumple con los parámetros analíticos deseados (Linealidad, exactitud, precisión, especificidad y estabilidad) correctamente en base a las pruebas de laboratorio, se considerará como un método adecuado y confiable para su utilización en el control de calidad de dicho medicamento, en pruebas de rutina. Ya que se tendrán bases perfectamente documentadas de su correcto funcionamiento para los fines analíticos perseguidos.



## VI. MATERIAL Y MÉTODO

### A. Material, Reactivos y Equipo

- 5 Matraces volumétricos de 25ml (Pyrex)
- 5 Matraces volumétricos de 50ml (Pyrex)
- 5 Matraces volumétricos de 100ml (Pyrex)
- 3 Matraces volumétricos de 200ml (Pyrex)
- 5 Pipetas volumétricos de 2ml (Pyrex)
- 5 Pipetas volumétricas de 3ml (Pyrex)
- 5 Pipetas volumétricas de 5ml (Pyrex)
- 5 Pipetas volumétricas de 15ml (Pyrex)
- 1 Pipeta graduada de 10ml (P K)
- 5 Embudos de filtración (P K)
- 1 Probeta de 100ml (P K)
- 5 Vasos de precipitados de 100ml (Pyrex)
- 1 Vaso de precipitados de 1000ml (Pyrex)
- 2 Celdas espectrofotométricas de 1cm (Cuarzo, Bausch & Lomb)
- 1 Soporte universal
- 3 Anillos metálicos
- 4 Barras magnéticas
- Papel aluminio
- Papel filtro porosidad media (Whatman no. 41)
- Papel glassine

**Reactivos:**

- Clorhidrato de clordiazepóxido (Materia prima Q.P.Lote 4-89)
- Clorhidrato de clordiazepóxido (Estándar primario USP)
- Placebo para tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido
- Etanol (Grado reactivo, Baker)
- Metanol (Grado reactivo, Baker)
- Acido sulfúrico (Baker, 95.7%)

**Equipo:**

- Espectrofotómetro (Spectronic 2500)
- Balanza analítica (Digital Fisher Scientific XA)
- Parrilla de agitación (Molda A. 60Hz. 1-5)

**B. Método Analítico para Cuantificación de  
Clorhidrato de Clordiazepóxido en Tabletas**

Pesar y triturar no menos de 20 tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido y determinar el peso medio por tableta, transfiera una porción de polvo exactamente pesada equivalente a 60mg de clorhidrato de clordiazepóxido en un matraz volumétrico de 100ml agregue metanol hasta un volumen de aforo, mezclar y filtrar. Descartar los primeros 15 ml de filtrado. Pipetear 5 ml de la solución clara a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar al aforo con solución de alcohol acidificado (ácido sulfurico en etanol 1:360) y mezclar. Pipetear 10 ml de ésta y colocar en un matraz volumétrico de 50 ml y aforar con alcohol acidificado. Esta solución contiene 6 µg/ml.

El estándar se prepara de la siguiente forma: Pesar 60 mg de estándar de referencia U. S. P. de clorhidrato de clordiazepóxido, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml aforar con metanol, diluya 1 ml de ésta solución en un matraz volumétrico de 100 ml., aforar con alcohol acidificado, ésta solución contiene una concentración de 6µg/ml. Determine concomitantemente la absorbancia de la solución en celdas de 1 cm a 245 nm con espectrofotómetro adecuado, usando alcohol acidificado como blanco.

A partir de la siguiente relación determine el porciento de clorhidrato de clordiazepóxido de la muestra (Fórmula 2):

$$\frac{A_m}{A_{std}} \times \frac{C_{std}}{C_m} \times P = \% \text{ de clorhidrato de clordiazepóxido.}$$

En donde  $A_m$  = Absorbancia de la muestra

$A_{std}$  = Absorbancia del estándar.

$C_{std}$  = Concentración en  $\mu\text{g/ml}$   
del estándar.

$C_m$  = Concentración en  $\mu\text{g/ml}$   
de la muestra

$P$  = Pureza del estándar.

(Fórmula 2) Determinación del clorhidrato de  
de clordiazepóxido en las muestras.

## 1. MODIFICACIONES A LA TÉCNICA ANALÍTICA

a. Muestra. Se pesaron 10 mg de principio activo (Clorhidrato de clordiazepóxido) y placebo equivalente a la formulación de las tabletas. Se disolvieron y agitaron durante 10 min con metanol en matraces volumétricos de 50 ml se tomaron alícuotas de 5 ml del filtrado y se diluyeron en matraces aforados de 100 ml con alcohol acidificado, de aquí se tomaron 15 ml y se aforaron en matraces de 25 ml con el mismo medio. Para obtener una concentración final de  $6\mu\text{g/ml}$ .

b. Estándar. Se pesaron 10mg de estándar de clorhidrato de clordiazepóxido y se disolvieron en metanol en un matraz aforado de 50 ml, se tomó una alícuota de 3 ml y se aforó a 100 ml con alcohol acidificado, obteniéndose una solución a concentración de  $6\mu\text{g/ml}$ .

### C. Linealidad del Espectrofotómetro

-- Se pesaron 5 muestras de cada nivel de concentración a 50, 80, 100, 120 y 150% (El 100% corresponde a la formulación de las tabletas, 10 mg de clorhidrato de clordiazepóxido) de estándar primario de principio activo.

-- Se les aplicaron las diluciones del método analítico antes descrito.

-- Se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro a 245 nanómetros.

-- Con los datos obtenidos de las absorbancias se calculó la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación, y el coeficiente de determinación para obtener la linealidad del sistema. Se verificó la linealidad con ayuda del análisis de la varianza (ANADEVA).

### D. Precisión del Sistema

-- Se pesaron 6 muestras de estándar al 100%

-- Se tomaron las lecturas a 245 nm y con los resultados obtenidos de absorbancia se evaluó la precisión con el coeficiente de variación.

#### E. Linealidad del Método.

--Se pesaron cantidades equivalentes a 50, 80, 100, 120 y 150% de clorhidrato, cinco repeticiones cada nivel. Se pesaron cantidades equivalentes a la formulación, de placebo.

-- Se aplicó la metodología de análisis para cada muestra.

-- Se tomaron las lecturas en el espectrofotometro a 245 nanómetros y se calcularon las concentraciones.

-- Se calculó la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación y el coeficiente de correlación para obtener la linealidad del método analítico. Se verificó la linealidad con ayuda del análisis de la varianza (ANADEVA) y con ayuda del estadígrafo de contraste "t" de student.

## F. Precisión del Método

1. REPETIBILIDAD. Se realizaron seis pesadas de clorhidrato de clordiazepóxido para cada nivel 80, 100 y 120%, se llevaron a cabo el mismo número de pesadas de placebo correspondientes.

-- Se trataron las muestras siguiendo el método analítico descrito. Se corrieron estándares para cada nivel.

-- Se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro a 245 nanómetros.

-- Con los resultados obtenidos se evaluó estadísticamente la precisión con el estadígrafo " $\chi^2$ " y con el coeficiente de variación.

2. REPRODUCIBILIDAD. Se pesaron tres muestras de clorhidrato de clordiazepóxido de 10 mg y sus cantidades equivalentes de placebo respetando la formulación. Trabajaron dos analistas de la misma forma en dos días diferentes.

-- Se corrieron estándares.

-- Se siguió la metodología normal de análisis para cada muestra. Se tomaron lecturas a 245 nm.

-- Con los resultados obtenidos se evaluó estadísticamente con un modelo de factores aleatorios el efecto del analista, del día y las interacciones analista-día. (ANADEVA).



#### G. Exactitud del Método al 100%

-- Se pesaron diez muestras de clorhidrato de clordiazepóxido al 100% (10mg) de la formulación y sus correspondientes placebos.

A su vez una muestra de estándar.

-- Se trataron con la metodología de análisis.

-- Se tomaron lecturas a 245nm.

-- Con los resultados obtenidos de los análisis se evaluó la exactitud estadísticamente, a través del estadígrafo "t" de student Y con el intervalo de confianza.

#### H. Especificidad del Método

-- Se realizaron cinco pesadas de placebo respetando la formulación.

-- Se pesaron cinco muestras más de placebo cargado a la concentración central (10mg).

-- Se analizaron con la metodología descrita.

-- Se calculó el porcentaje de interferencia.

## I. Estabilidad de las Muestras

-- Las muestras ocupadas para exactitud del metodo se analizaron al trascurrir 30 min, 1, 2, 4 y una ultima medicion a las 24 hr bajo condiciones normales de almacenamiento (Protegidas de la luz), con esto se observó la estabilidad de las muestras. Se estudiaron los resultados obtenidos estadísticamente con el cálculo de la media del factor "I" para contrastarse con el intervalo de confianza.

## VII. RESULTADOS

### A. Linealidad del Sistema

#### 1. EVALUACIÓN CON REGRESIÓN LINEAL

TABLA 4. Resultados de absorbancia de estándar de clorhidrato de clordiazepóxido a diferentes niveles.

Cantidad adicionada		Absorbancia
Std. ( mg ) "X"		"Y"
50%	5.0	0.315
	5.5	0.362
	4.4	0.290
	5.4	0.353
	4.8	0.333
80%	7.9	0.535
	8.0	0.493
	8.4	0.522
	8.2	0.511
	8.3	0.528
100%	10.2	0.614
	10.3	0.648
	9.9	0.620
	10.6	0.646
	9.4	0.578

Continuación TABLA 4.

120%	12.4	0.763
	12.1	0.740
	12.3	0.754
	12.2	0.736
	11.9	0.706
150%	15.5	0.952
	15.9	0.956
	15.6	0.959
	15.2	0.906
	14.5	0.884

Pendiente del Sistema

$$m = 0.0578$$

Ordenada al Origen

$$a = 0.0407 \cong 0$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = 0.9961 \cong 1$$

Coefficiente de correlación

$$r = 0.9980$$

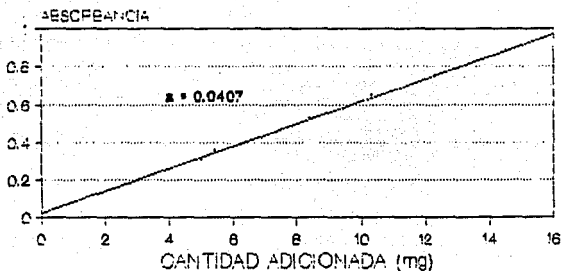
Ecuación de la Recta

$$Y = mx + a$$

$$Y = (0.0578) (x) + (0.0407)$$

Se considera al sistema como lineal debido a los resultados anteriores. (Consultar el ANEXO para las fórmulas ocupadas)

## LINEALIDAD DEL SISTEMA ESTANDAR PRIMARIO



$r = 0.9980$

$r^2 = 0.9961$

RESPUESTA ESPECTROFOTOMETRICA  
ABSORBANCIA DEL OLOPHIDRATO DE  
OLOPIAZEPOXIDO (GRAFICA 1)

## 2. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

### a. Análisis de Varianza

Se determinó con el análisis de varianza de la regresión lineal, si existe asociación entre la variable "X" y "Y".

Tabla de Anadeva

TABLA 5.

Fuente de variación	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Media cuadrática MC	F calculo
Regresión	gl R = 1	SCR = 1.033	MCR= 1.033	5243.6548
Error de Regresión	gl ER = 23	SCER = 0.00455	MCER= 0.000197	

Los resultados del análisis de varianza para la regresión lineal son satisfactorios. La linealidad se verifica a través de este estudio.

### B. Precisión del Sistema

TABLA 6. Análisis de estándar de clorhidrato de clordiazepóxido al 100%. Respuestas de absorbancia obtenidas.

No de muestra	Absorbancia
1	0.601
2	0.629
3	0.626
4	0.609
5	0.614
6	0.625

Valor obtenido del coeficiente de variación:

$$\text{C.V.} = 1.25\%$$

El valor de coeficiente de variación es menor al valor aceptado ( $\text{C.V.} \leq 1.5\%$ ), por lo tanto consideramos al sistema como preciso.

C. Linealidad del Método

1. EVALUACIÓN CON REGRESIÓN LINEAL

Cantidad Adicionada		Cantidad recuperada
	Muestra (mg) "X"	(mg) "Y"
50%	4.8	4.47
	5.5	5.45
	4.8	4.64
	5.5	5.47
	4.8	5.03
80%	8.0	7.82
	8.6	7.86
	8.1	7.51
	8.1	7.81
	8.3	7.84
100%	9.9	9.83
	9.6	9.56
	10.2	9.91
	10.3	10.33
	9.9	9.99
120%	11.9	11.57
	12	12.06
	12.4	12.01
	12.6	12.37
	12.6	12.81

TABLA 7. Clorhidrato de clordiazepóxido a 5 niveles.



Continuación TABLA 7. Cantidad adicionada contra cantidad recuperada de clorhidrato de clordiazepóxido a cinco niveles de concentración.

150%	15	14.34
	14.8	14.94
	15.6	15.44
	15.9	15.67
	15.2	14.85

Resultados de la regresión lineal: (Consultar formulas en el ANEXO)

Pendiente del Método

Ordenada al origen del Método

$$m = 0.9938 \cong 1$$

$$a = -0.1329 \cong 0$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = 0.9947 \cong 1$$

Coefficiente de correlación

$$r = 0.9973$$

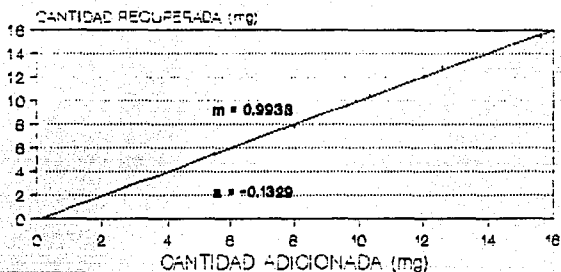
Ecuación de la Recta

$$Y = m x + a$$

$$Y = (0.9938) (x) + (-0.1329)$$

Se puede considerar que el método analítico estudiado es lineal o tiene un comportamiento lineal ya que la pendiente (m) es muy cercana a 1, la ordenada al origen es aproximadamente cero y el coeficiente de determinación es cercano a uno.

## LINEALIDAD DEL METODO CLORHIDRATO DE CLORDIAZEPOXIDO



DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA  
DE MUESTRAS DE CLORHIDRATO DE  
CLORDIAZEPOXIDO (GRAFIO 2)

$r = 0.9973$

$r^2 = 0.9947$

## 2. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

### a. Pendiente

Planteamiento de la hipótesis:

$$H_0 : m = 1$$

$$H_1 : m \neq 1$$

Valores del estadígrafo de contraste "t" de student:

$$t_{\text{cálculo}} = 0.33119$$

$t_{\text{tablas}}$  cuando:  $\alpha = 0.05$  y  $gl = n-2 = 23$

$$t_{\left(\frac{1-\alpha}{2}\right)} = 2.0687$$

$$t_{\left(\frac{\alpha}{2}\right)} = -2.0687$$

Criterio de decisión:

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{cálculo}} \leq t_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

Contraste de los resultados obtenidos:

$$\boxed{-2.0687 \leq -0.33119 \leq 2.0687}$$

Se acepta la hipótesis  $H_0 : m = 1$  y se puede considerar el método como lineal en base al criterio antes señalado.

(Consultar las fórmulas en el ANEXO)

b. Intervalo de Confianza

-Fórmula-

$$m \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}} \times \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

En donde :  $m = 0.9938$       g.l. =  $n-2$      $n = 25$

$$t_{\text{tablas}} = 2.0687$$

$$S_{y/x} = 0.3267$$

$$S_x = 3.5656$$

El intervalo resultante es el siguiente:

$$0.9552 \leq 0.9938 \leq 1.0324$$

El intervalo de confianza es adecuado al valor resultante y por lo tanto podemos considerar, en base a este criterio, al método como lineal.

c. Ordenada al Origen

Planteamiento de la hipótesis:

$$H_0 : a_0 = 0$$

$$H_1 : a_0 \neq 0$$

Valores del estadígrafo de contraste "t" de student:

$$t_{\text{cálculo}} = -0.6605$$

$$t_{\frac{\alpha}{2}} = -2.0687$$

tablas

$$t_{1-\frac{\alpha}{2}} = 2.0687$$

Criterio de decisión :

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{cálculo}} \leq t_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

Contraste de los resultados obtenidos:

$$-2.0687 \leq -0.6605 \leq 2.0687$$

En base al criterio anterior se considera que la ordenada al origen es igual a cero y por lo tanto el método tiene un comportamiento lineal.

### c. Analisis de Varianza

Se determinó con el análisis de varianza de la regresión lineal, si existe asociación entre la variable "X" y "Y".

Tabla de Anadeva

TABLA B. (Ver el ANEXO para fórmulas)

Fuente de variación	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Media cuadratica MC	F calculo
Regresión	gl R = 1	SCR = 300.796	MCR= 300.796	2815.9155
Error de Regresión	gl ER = 23	SCER = 2.4569	MCER= 0.10682	

Los resultados del análisis de varianza para la regresión lineal son satisfactorios. La linealidad se verifica a través de este estudio.

D. Exactitud del Método al 100%

TABLA 9. Resultados de cantidad recuperada contra cantidad adicionada de clorhidrato de clordiazepóxido al 100%.

Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada
Muestra (mg)	(mg)
10.3	10.33
9.9	9.83
9.9	9.99
10.6	10.54
10.6	10.65
10.3	10.20
10.5	10.36
9.6	9.56
10.6	10.43
10.5	10.31

1. EVALUACIÓN A TRAVÉS DEL INTERVALO DE CONFIANZA

Cálculo del intervalo de confianza con ayuda del estadígrafo "t" de student. (Consultar el ANEXO para fórmulas auxiliares)

Fórmula: 
$$\bar{X} \pm t_{0.975} \frac{S\%}{\sqrt{n}}$$

En donde:  $gl = n - 1$        $\alpha = 0.05$

$t_{0.975} = 2.2622$

$S\% = 0.9037$

Criterio de decisión:

$$98.8095 \leq 99.456 \leq 100.1025$$

Se considera al método analítico como exacto debido a que el intervalo de confianza contiene al 100%.

2. EVALUACIÓN CON EL ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

"t" DE STUDENT

Planteamiento de la Hipótesis:

$$H_0 : \mu = 100\%$$

$$H_1 : \mu \neq 100\%$$

Valores obtenidos del estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{cálculo}} = -1.9040$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.2622$$

Criterio de decisión :

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{cálculo}} \leq t_{\frac{1-\alpha}{2}}$$

Contraste de los resultados obtenidos:

$$-2.2622 \leq -1.9040 \leq 2.2622$$

Por lo tanto se acepta la hipótesis  $H_0 \mu = 100\%$  ya que los valores quedan dentro del criterio de aceptación. Se considera que el método es exacto.



E. Precisión del Método

1. REPETIBILIDAD

TABLA 10. Clorhidrato de clordiazepóxido analizado a tres diferentes niveles, (80, 100 y 120%).

Cantidad Adicionada		% Recobro
<u>Muestra</u> (mg) "X"		
80%	8.0	97.75
	8.10	96.43
	8.3	98.83
	8.3	98.26
	8.0	99.01
	8.1	96.41
100%	10	97.55
	10.3	100.35
	9.9	100.97
	10.5	99.81
	10	104.00
	10	101.1

Continuación TABLA 10.

120%	12.6	98.18
	12.6	101.69
	12.1	97.91
	12.4	97.76
	12.4	95.41
	12.7	95.60

a. Evaluación Estadística con el Coeficiente de Variación (C.V.)

$$C.V. = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

Media del porcentaje de recobro =  $\bar{Y}$  = 98.72

Desviación estándar del % de recobro = S = 2.262

$$C.V. = 2.2917$$

Criterio de Aceptación

$$C.V. \leq 3\%$$

$$2.2917 \leq 3\%$$

Por lo tanto nuestro método es repetible debido a que el coeficiente de variación es menor a 3%. Límite aceptado para métodos espectrofotométricos.

b. Evaluación con el Estadígrafo " $\chi^2$ "

Planteamiento de la hipótesis:

$$H_0 : \sigma \leq 2\%$$

$$H_1 : \sigma > 2\%$$

Valores obtenidos para el estadígrafo " $\chi^2$ ":

$$\underline{\chi^2_{\text{cálculo}} = 21.745}$$

En donde:  $\alpha = 0.05$

$$g_1 = n - 1 = 17$$

$$\underline{\chi^2_{\text{tablas}} = 30.191}$$

Área de Aceptación

$$\chi^2_{\text{cálculo}} \leq \chi^2_{\text{tablas}}$$

Contraste con los resultados obtenidos:

$21.745 \leq 30.191$
----------------------

En base al criterio anterior se considera al método como repetible ya que nuestros parámetros quedan dentro del Área de aceptación.

## 2. REPRODUCIBILIDAD

TABLA 11. Resultados en porcentaje de recobro del clorhidrato de clordiazepóxido.

	Día 1	Día 2
Analista 1	104.57	97.52
	104.6	101.2
	100.86	97.79
Analista 2	101.80	104.11
	97.05	100.21
	103.18	97.34

### Resultados de Fcálculo y Ftablas

(Consultar el ANEXO para tabla de ANADEVÁ y sus fórmulas)

$$F_{\text{cálculo } A_i} = 0.125$$

$$F_{\text{cálculo } D_j} = 1.288$$

$$F_{\text{cálculo } A_i D_j} = 1.697$$

Ftablas	En donde: $\alpha = 0.05$	Fo. $\alpha$
Analista $A_i$	$\frac{q_1 A}{q_1 AD}$	161.4
Día $D_j$	$\frac{q_1 D}{q_1 AD}$	161.4
Interacción $A_i D_j$	$\frac{q_1 AD}{q_1 E}$	5.32

Criterio de aceptación:

$$F_{\text{Calculo}} \leq F_{\text{tablas}}$$

Contraste de los valores obtenidos de "F":

Analista Ai	$0.125 \leq 161.4$
Dia Dj	$1.288 \leq 161.4$
Interacción AiDj	$1.697 \leq 5.32$

En base al criterio de decisión no existe efecto de analista, no se presentó efecto en los diferentes días y no existe efecto de interacción analista-día. Puesto que se cumplen las tres condiciones el método es reproducible.

F. Especificidad del Método

TABLA 12. Clorhidrato de clordiazepóxido,  
materia prima al 100%.

Cantidad Adicionada (mg)	Absorbancia
10.3	0.632
9.9	0.619
10.6	0.653
10.6	0.646

TABLA 13. Muestras de placebo para tabletas de clorhidrato  
de clordiazepóxido.

Placebo (mg)	Absorbancia
107.7	0.006
108.8	0.002
109.6	0.002
108.3	0.001
112.5	0.003

Muestra

Placebo

$\bar{X}_{Abs.} = 0.6318$

$\bar{X}_{Abs.} = 0.0028$

Porcentaje de interferencias:

0.4431%

Por tanto consideramos que el método es específico debido al

bajo porcentaje de interferencia calculado en la absorbancia en muestras de placebo y placebo cargado.

### G. Estabilidad de las Muestras

TABLA 14. Muestras de clorhidrato de clordiazepoxido almacenadas protegidas de la luz y analizadas a diferentes tiempos.

Cantidad add. (mg)	Abs. Inicial	Abs. 1 hr	Abs. 2 hr
1. 10.1	0.683	0.674	0.674
2. 10.3	0.607	0.594	0.596
3. 10	0.598	0.590	0.586
4. 10	0.580	0.571	0.571
5. 10.4	0.620	0.616	0.610

Cantidad add. (mg)	Abs. 3 hr	Abs. 4 hr	Abs. 24 hr
1. 10.1	0.674	0.677	0.639
2. 10.3	0.600	0.600	0.568
3. 10	0.607	0.594	0.561
4. 10	0.588	0.574	0.543
5. 10.4	0.618	0.618	0.586

a. Evaluación con el Factor "I".

Valor de media del Factor "I" para cada tiempo

1 hr	2hr	3hr	4hr	24hr
98.69	98.332	99.968	99.184	93.82

Las muestras son estables cuando el valor de la media del del factor "I" se encuentra comprendido entre 97% - 103%. Limite para metodos espectrofotometricos. (Consultar el ANEXO).



## VIII. DISCUSION.

Linealidad del Sistema: En base a los resultados obtenidos se puede observar que el coeficiente de determinación ( $r^2 = 0.99$ ) y el de correlación cumplen con el criterio de aceptación ( $r^2 \geq 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ) correspondiente. Por lo tanto, podemos considerar al sistema de medición como lineal, es decir, las respuestas son proporcionales a la cantidad de muestra analizada.

El análisis de varianza confirma estadísticamente la linealidad del sistema.

Precisión de sistema: Puesto que el coeficiente de variación (C.V.=1.25%) fue menor al límite aceptado (C.V.  $\leq 1.5\%$ ) se considera al espectrofotómetro como preciso, ya que presentó concordancia en sus respuestas.

Linealidad del Método: En base a los resultados obtenidos se observa que la pendiente y la ordenada al origen son cercanas a uno y cero respectivamente ( $m = 0.9938 \cong 1$ ;  $a = -0.132 \cong 0$ ), así también el coeficiente de determinación ( $r^2 = 0.9947$ ) y el de correlación ( $r = 0.9973$ ) cumplen con el criterio de decisión correspondiente ( $r^2 \geq 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ) para la linealidad del método, lo que indica que responde proporcionalmente a la cantidad adicionada.

La estimación de la linealidad a través del intervalo de

confianza con ayuda de la pendiente calculada, la ordenada al origen y el estadígrafo "t" de student indica que el método es lineal al cumplir con los criterios de aceptación.

**Exactitud y Repetibilidad del Método:** La exactitud del método arrojó resultados confiables, al estimarla a través del intervalo de confianza nos indica que contiene al 100% ( $98.809 \leq 100 \leq 100.102$ ) lo que demuestra que el método analítico es exacto al 100%. Así lo demuestra la decisión a través de la "t" de student, aceptando la hipótesis  $\mu = 100\%$ ; ya que los valores calculados quedan dentro del intervalo de confianza por, lo tanto, existe confiabilidad en los datos registrados.

La repetibilidad del método es aceptable ya que al evaluar los resultados obtenidos a través del coeficiente de variación (C.V. = 2.2917%) fue menor al 3%, límite aceptado para un método espectrofotométrico. La evaluación estadística a través del estadígrafo " $\chi^2$ " lo demuestra al ser menor la " $\chi^2$ " calculada (21.745) que la " $\chi^2$ " tablas (30.191) lo que indica que el método es repetible a cualquiera de los niveles estudiados 80, 100 y 120%.

**Reproducibilidad:** Al ser evaluados los resultados con el modelo aleatorio se demostró que el método analítico no presenta efecto cuando es llevado a cabo por diferentes analistas, así lo demostró el estadígrafo "F" calculado (0.125) al ser menor que "F" tablas (161.4). Así también, no existió efecto o diferencia al ser analizado en diferentes días y no existió efecto al evaluar las interacciones de estos dos factores analista-día, al ser analizados

con el estadígrafo de contraste "F". Al cumplirse las tres condiciones se puede afirmar que el método analítico para clorhidrato de clordiazepóxido es reproducible.

Especificidad : Al ser analizadas muestras de placebo y de placebo cargado se obtuvo como resultado una interferencia de 0.4431%, por lo que el método analítico se considera como específico, ya que la interferencia es baja y no altera los análisis de muestras, es decir, los excipientes no alteran la absorbancia del principio activo o no absorben a la longitud similar de este, por lo que el método es confiable.

Estabilidad de las Muestras: Las muestras fueron estables bajo condiciones adecuadas de almacenaje, es decir, protegidas de la luz y a temperatura ambiente ya que las lecturas tomadas durante las primeras 4 horas marcan una diferencia de centésimas lo que no afecta los resultados e indica estabilidad. Sin embargo, al transcurrir 24 horas las lecturas de absorbancia tienen grandes diferencias lo que nos indicó degradación e inestabilidad al transcurrir dicho intervalo de tiempo. Así lo demostró el análisis estadístico con la media del factor "I" para cada tiempo. Los valores de las primeras 4 horas se encuentran dentro del intervalo de confianza para métodos espectrofotométricos (97%-103%). El resultado a las 24 hrs se sale de este intervalo lo que indica degradación de la muestra.

En base al análisis anterior se observa que la linealidad y la precisión del sistema de medición (Espectrofotómetro) son

confiables para llevar a cabo la validación, con esto se asegura que el equipo respondió de acuerdo a las necesidades del método y no interfirió en los resultados. El sistema da respuestas proporcionales a la cantidad de estándar en el rango establecido, con una dispersión baja.

Al llevar a cabo el estudio del método analítico se demostró que no tiene error, ya que presenta exactitud al evaluarlo al 100% y presenta concordancia en sus resultados, es decir, una dispersión baja a las diferentes concentraciones estudiadas. por lo que en el intervalo estudiado los resultados que se obtuvieron son confiables.

Se puede afirmar con este estudio que el método responde proporcionalmente a la cantidad de muestra analizada en el intervalo de 50% al 150% de concentración. También se observa que no existe efecto sobre el método al ser aplicado por diferentes analistas y días, es decir, el cambio en estas condiciones no altera los resultados.

Los factores involucrados en el estudio fueron evaluados estadísticamente y se confirmó que no influyen sobre el método espectrofotométrico.

## IX. CONCLUSIONES

En base a todo el programa de análisis químico y estadístico llevado a cabo para el método analítico espectrofotométrico aplicado a tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido, se concluye que dicho método es lineal, exacto, repetible, reproducible y específico, por lo tanto, podemos utilizarlo como método adecuado para el análisis químico de las tabletas antes mencionadas, sin olvidar que el sistema de medición (Espectrofotómetro) se encuentre en condiciones óptimas de trabajo. Se puede afirmar que las muestras de análisis son estables bajo condiciones adecuadas de protección a la luz y a temperatura ambiente por un periodo no mayor de cuatro horas.

Por lo tanto se puede considerar al método analítico espectrofotométrico como válido o validado para el análisis de tabletas de clorhidrato de clordiazepóxido, debido a que cumplió con los parámetros estudiados correctamente. Por lo cual los resultados a través de este método serán confiables en lo sucesivo para análisis de rutina de las muestras obtenidas, siendo el control de calidad de el medicamento óptimo, si es correctamente utilizado considerando las buenas prácticas de análisis que deben estar presentes en todos los laboratorios farmacéuticos, todo esto para obtener resultados confiables.

## X. ANEXO

Formulario y criterios de decisión para los análisis estadísticos utilizados en la validación.

### A. Linealidad del Sistema

Estimación con la regresión lineal:

Calculo de la pendiente (m):

$$m = \frac{n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

Calculo de la ordenada (a):

$$a = \bar{Y} - m \bar{X}$$

Coefficiente de determinación ( $r^2$ ):

$$r^2 = \frac{[n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)]^2}{[n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2][n(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]}$$

Coefficiente de correlación (r):

$$r = \sqrt{r^2}$$

n= número de datos

X= variable independiente  
(cantidad adicionada)

Y= variable dependiente  
(respuesta obtenida)

$\bar{X}$  y  $\bar{Y}$ = medias aritmeticas

a= ordenada al origen

**Análisis de Varianza en regresión lineal:**

**Tabla de Anadeva**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F cal.
Regresión	GLR = 1	SCR= $m(\Sigma XY) + b(\Sigma Y) - \frac{(\Sigma Y^2)}{n}$	MCR= $\frac{SCR}{GLR}$	$\frac{MCR}{MCER}$
Error de Regresión	GLER= n-2	SCER= $\Sigma Y^2 - m(\Sigma XY) - b(\Sigma Y)$	MCER= $\frac{SCER}{GLER}$	

Criterio de decisión: Si el sistema cumple con las siguientes condiciones se considera lineal.

$$r^2 \geq 0.98$$

$$r \geq 0.99$$

B. Precisión del sistema de medición. Se evalúa con el coeficiente de variación:

Fórmula para calcular el coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

S = Desviación estándar.

$\bar{Y}$  = Media de la respuesta

### C. Linealidad del método.

a. Estimación con la regresión lineal, se utilizan las fórmulas ocupadas para linealidad del sistema con las siguientes diferencias:

X = variable independiente  
(cantidad adicionada)  
Y = variable dependiente  
(cantidad recuperada)

Criterio de decisión para la linealidad del método. Si cumple con las siguientes condiciones el método se considera lineal.

$$a \cong 0$$

$$m \cong 1.0$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$r \geq 0.99$$

b. Linealidad del método con ayuda del estadígrafo de contraste "t" de student.

Evaluación con ayuda de la pendiente (m)

Fórmula para "t" de cálculo:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{(m - m_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

Fórmulas para cada uno de los términos requeridos:

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



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

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

Significado de los términos:  $S_{y/x}$  = Error típico

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

$S_x$  = Desviación estándar.

$n$  = número de datos.

$\alpha$  = nivel de significancia

$gl$  = grados de libertad

t tablas

Cuando:

$\alpha = 0.05$

$gl = n-2$

Criterio de decisión:

$t_{\alpha/2}$	$\leq$	$t_{\text{cálculo}}$	$\leq$	$t_{1-\alpha/2}$
----------------	--------	----------------------	--------	------------------

Si se cumple con el criterio de decisión se considera al método lineal.

c. Evaluación estadística a través del intervalo de confianza. Con la pendiente calculada (m).

Fórmula para calcular el intervalo:

$$m \pm t_{\frac{1-\alpha}{2}} * \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

En donde: t tablas

$$gl. = n - 2$$

$$\alpha = 0.05$$

Criterio de decisión: El intervalo de confianza debe contener el valor de pendiente (m = 1). Si cumple con el criterio se considera al método lineal.

d. Evaluación a través de la ordenada al origen con el estadígrafo de contraste "t" de student.

Fórmula para cálculo:

$$t_{\text{cálculo}} = \frac{a - a_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

En donde: t tablas

$$\alpha = 0.05$$

$$gl. = n - 2$$

Criterio de decisión:

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{cálculo}} \leq t_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

Si se cumple con el criterio anterior se considera que la ordenada al origen es igual a cero y por lo tanto satisface el criterio para linealidad del método.

D. Exactitud del Método al 100%. Se evaluó estadísticamente con el intervalo confianza.

a. Fórmula para calcular el intervalo de confianza:

$$\bar{X}\% \pm t_{0.975} \frac{S\%}{\sqrt{n}}$$

Para t tablas se consideran los siguientes datos:

$$g.l. = n - 1 \quad \alpha = 0.05$$

Término requerido para calcular el intervalo:

$$S\% = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X}\%)^2}{n-1}}$$

Términos utilizados:

$\bar{X}\%$  = Media en porcentaje

S% = Desviación estándar en porcentaje.

Criterio de decisión:

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{cálculo}} \leq t_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

El intervalo de confianza debe contener al 100% para considerarse al método como exacto.

- b. Evaluación de la Exactitud con el estadígrafo de contraste "t" de student.

Fórmula para calcular la t de student:

$$t_{\text{cálculo}} = \frac{\frac{\bar{X}\% - \mu}{S\%}}{\sqrt{\frac{1}{n}}}$$

$\mu$  = media 100%

t tablas :

$$gl. = n - 1$$

$$\alpha = 0.05$$

Criterio de decisión:

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{cálculo}} \leq t_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

Se considera exacto si cumple con el criterio de decisión.

E. Precisión:

1. Repetibilidad. Evaluación a través del coeficiente de variación. (C.V.)

- a. Fórmula para el cálculo del coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{Y}} \times 100$$

S = Desviación estándar del porcentaje de recobra.

$\bar{Y}$  = media del porcentaje de recobra.

Criterio de aceptación para método espectrofotométrico:

$$C.V. \leq 3\%$$

Si el coeficiente de variación es menor o igual al 3% se considera al método repetible.

b. Evaluación a través del estadígrafo " $\chi^2$ ":

$$\text{Fórmula: } \chi^2_{\text{calculado}} = \frac{(n-1)(S\%)^2}{\sigma^2}$$

En donde:

$\sigma^2$  = varianza poblacional

$$\sigma = 2$$

$$\chi^2_{\text{tablas}} \quad \alpha = 0.05$$

$$gl = n - 1$$

Área de aceptación :

$$\chi^2_{\text{calculado}} \leq \chi^2_{\text{tablas}}$$

Si cumple con el criterio se considera al método repetible.

2. Reproducibilidad: A través del modelo de factores aleatorios. Análisis de varianza. (ANADEVA)

Se evalua el efecto del: Analista =  $A_i$

Días =  $D_j$

Interacción Analista-día =  $A_i-D_j$

Simbología:

$E_{ijk}$  = Error experimental

$c - k$  = número de repeticiones por análisis. Igual para los analistas.

$a - i$  = número de analistas.

$b - j$  = número de días.

Para obtener el valor de "F" de cálculo se deben hacer las siguientes operaciones de la tabla de análisis de varianza.

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	"F" Cálculo
$A_i$ filas	$(i - 1)$	$\frac{\sum Y_i^2}{bc} - \frac{Y^2}{abc}$	$\frac{SC A}{i-1}$	$\frac{MC A}{MC AD}$
$D_j$ columnas	$(j - 1)$	$\frac{\sum Y_j^2}{ac} - \frac{Y^2}{abc}$	$\frac{SC D}{j-1}$	$\frac{MC D}{MC AD}$
$A_i-D_j$ interacción	$(i-1)(j-1)$	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{c} - \frac{\sum Y_i^2}{bc} - \frac{\sum Y_j^2}{ac} + \frac{Y^2}{abc}$	$\frac{SC AD}{(i-1)(j-1)}$	$\frac{MC AD}{MC Error}$
$E_{ijk}$	$ij(k-1)$	$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum Y_{ij}^2}{c}$	$\frac{SC E}{ij(k-1)}$	

Para obtener "F" tablas se deben hacer las siguientes consideraciones:

F tablas  $\alpha = 0.05$  FO.95

A <sub>i</sub>	$\frac{q1A}{q1AD}$	D <sub>j</sub>	$\frac{q1D}{q1AD}$	A <sub>i</sub> -D <sub>j</sub>	$\frac{q1AD}{q1E}$
----------------	--------------------	----------------	--------------------	--------------------------------	--------------------

Area de aceptación:

F <sub>cálculo A</sub>	≤	F <sub>tablas</sub>	No existe efecto por analista
F <sub>cálculo D</sub>	≤	F <sub>tablas</sub>	No existe efecto por día
F <sub>cálculo AD</sub>	≤	F <sub>tablas</sub>	No existe efecto por interacción

Si se cumplen los tres criterios de aceptación se considera al método reproducible.

F. Estabilidad de las muestras. Para cada condición/tiempo/muestra se calculo el factor (I) con la fórmula siguiente:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra/condición/tiempo})_i}{(\text{análisis inicial } i)} \times 100$$

Para cada condición/tiempo se calculó la media del factor (I).

$$\bar{I} = \frac{\sum I (\text{condición/tiempo})}{N}$$

N = número de muestras por cada condición/tiempo.

La media del factor (I) para cada condición/tiempo debe cumplir los siguientes criterios:

Método	Valor de $\bar{I}$
Cromatográficos	98 - 102%
Titrimétricos	98 - 102%
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103%
Microbiológicos	95 - 105%



## XI. REFERENCIAS

1. S.S.A. Dirección General de Control de Insumos de la Salud. "Gülas oficiales de validación". México. pp 1-38. 55-68. 1991.
2. Guerra J., Finkelson, M K. "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories". Pharmaceutical technology. pp 74-84. (1982).
3. Avallone, H. L. "Drug Substance Manufacture and Control". Pharmaceutical Engineering. 9/2/37-40. 57. (1989).
4. Fisher, R. B. "Compendio de Análisis Químico Cuantitativo". Interamericana. México D. F. 1981. pp 400-437.
5. Willard, H. H., Lynne L.M. "Metodos Instrumentales de Analisis". 2a Compañía Editorial Continental S. A. México 1980. pp.62-63.88-98.
6. Charlot B. "Química Analítica General". Tomo II. Toray - Mason S. A. España. 1975. pp 166-187.

7. Helman J.; "Farmacotecnia Teoria y Practica" Ed. Continental. México. 1982. pp 1707-1757.
8. Hoover, J. "Reminton's Pharmaceutical Sciences". Fifteenth ed. Mach Publishing Company. Easton, Pennsylvania USA 1975. pp 1007-1010.
9. Pranab, K B "NRM Spectral Study of Proton Transfer in Amitiptyline Hydrochloride - Chordiazepoxide Hydrochloride Combinations in Dipolar Aprotic Solvent" . Journal of Pharmaceutical Sciences. 69/2/ 138-140. (1980).
10. Florey K., Analytical Profiles of Drugs Substances. Vol I. Academic Press, Inc. USA. 1976. pp 15-51.
11. Biagi, G. Livi, O. "Specific Inhibicion of Binding to Benzodiazepine by 1, 2, 3 Triazole Derivatives". Journal of Pharmaceutical Sciences. 81/6/543-546. (1992).
12. William O. F., "Principios de Quimica Farmaceutica". Tomo I. Reverté S. A. España. 1988. pp 236-245.

13. Goodman L S and Gilman A G; "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica". 6a. Ed. Médica Panamericana. Argentina. 1982. pp 437-442. 1645.
14. William, R M. Jewell, W S. "Precipitated Abstinence in Orally Dosed Benzodiazepine-Dependent Dogs". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 255/2/ 744-755 (1990).

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Baird D C.; "Experimentación". 2a. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana S. A. México. 1991. pp 29-39. 172-175.
2. British Pharmacopeia. Vol II. Her Majestys Stationery Office. London. December 1988. pp 914-915.
3. Burke, D. and Sokoloff, H. "Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Clordiazepoxide and Amitriptyline Hydrochloride in two Component Tablet Formulations". Journal of Pharmaceutical Sciences. 69/2/ 138-140. (1980).
4. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Quinta Edición. S.S.A. Mexico 1988. pp 1078-1085.
5. Haber A., Runyon P. ; "Estadística general". Iberoamericana EUA 1986. pp. 253-258. 260-271.
6. Kreyszig E. ; "Introducción a la estadística matemática". Limusa. México. 1991. pp 163-169.

7. Lednicer D., Lester A.; "The Organic Chemistry of Drug Synthesis" Vol 1 Ed. John Wiley and Sons. U S A. 1977. pp 362-371.
8. Leonar U., Auke D., Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures. El Sevier Scientific Publish Company. 1978. pp 7-25.
9. Remington. "Farmacia" 17a. Tomo I. Ed. Panamericana. Argentina. 1987. pp 846-859. 2178-2188.
10. Román García F. "Validación de Procesos para Productos Farmacéuticos no Estériles. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 18/3/ 2-12. (1987).
11. S S A. Dirección General de Control de Insumos de la Salud. "Guías oficiales de validación". México. 1989.
12. Tapia, I. Lira, O. "Desarrollo y Validación de Metodos Analíticos para el Ensayo de Pureza de Diversos Solventes". Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas. 21/6/ 41-43. (1991).
13. The Merck Index. Tenth edition. Merck Co, Inc. Rahway, N J, U S A. 1983. pp 2084.

14. The United States Pharmacopeia, Twenty-First Revision. NF 6 ed. Official from January 1, 1985. pp 193-7.
15. Velazquez L B. ; "Farmacología y su Proyección a la Clínica". 15a. Ed. Oteo. España. 1987. pp 270-274.
16. Wolfgang S. and Geertruida M. ; "Drug Level Monitoring" Ed. John Wiley and Sons. U S A. 1980. pp 173-177.
17. Ylla Catála M. "Validación de Procesos en la Industria Farmacéutica". Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas 21/1/ 17-22. (1990).