

33
2.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

“DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA DETERMINAR ACETATO DE
PREDNISOLONA, EN UNA SUSPENSION OFTALMICA,
QUE TAMBIEN CONTIENE CLORAMFENICOL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ZENON EGUILUZ SOTO



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: *Profra. María Luisa García Padilla*

Vocal: *Profra. Isaura Luisa Carrera García*

Secretario: *Profra. Consuelo Ayala Mondragón*

1er. Suplente: *Profra. Rosa Lorenia Mora Tovar y Chávez*

2do. Suplente: *Profra. Georgina Margarita Maya Ruiz*

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Control Analítico

Facultad de Química, U. N. A. M.

Coordinación de la Cooperación

Facultad - Empresa.

Ciudad Universitaria, México, D. F.

Tel 6223717

Asesor del Tema:

María Luisa García Padilla

Q.F.B. María Luisa García Padilla

Supervisor del Tema:

Rosalia Mora Tovar y Chávez

Q.F.B. Rosa Lorenia Mora Tovar y Chávez

Sustentante:

Zenón Eguíluz Soto

Zenón Eguíluz Soto

Agradezco muy atentamente a laboratorios Carnot Productos Científicos, S. A. , por su colaboración proporcionando las sustancias requeridas para la realización de éste estudio, en especial al Ing. Jorge Gay Molina por el apoyo que siempre ha brindado a nuestra Facultad.

A MIS PADRES

Gracias por todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera lograr mi meta, pero sobre todo gracias por su gran paciencia, ! lo tendré presente por siempre !

A MIS HERMANOS

Mario, Tasha, Dalila, Thelma, Nereida, Bertha, Velia, Paula, Graciela y Rafael; gracias por todo el apoyo que me han brindado y por ser cada uno de ustedes un ejemplo para mi.

A SALLY

Con todo mi amor para ti porque siempre has estado a mi lado brindándome apoyo, cariño y comprensión, espero lo disfrutes tanto como yo.

AL DEPARTAMENTO DE CONTROL ANALITICO

A las maestras:

Cristy, Chelo, Gina, Isaura, Tere, Lore y Ma. Luisa, gracias por todos esos consejos y palabras de aliento que me ayudaron a superar muchos obstáculos. En especial quiero felicitar a las maestras Ma. Luisa y Lorenia por ser tan profesionales en esos momentos difíciles de la vida.

A MIS AMIGOS

En general a todos los amigos que me rodearon a lo largo de este camino ofreciéndome su amistad. Mencionar nombres sería difícil y no quisiera omitir alguno, sin embargo, ellos saben quienes son.....

"Al igual que todos los jóvenes me proponía ser un genio, pero afortunadamente intervino la risa"

Clea, Laurence Durrell

CONTENIDO

Página

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	4
III.	GENERALIDADES	
	III.1 Corticoesteroides	5
	III.2 Monografía de Acetato de Prednisolona	12
	III.3 Validación de Métodos Analíticos	20
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	
	IV.1 Desarrollo del método Analítico	32
	IV.2 Validación del Método Analítico	35
V.	RESULTADOS	
	V.1 Resultados	38
VI.	CONCLUSIONES	
	VI.1 Conclusiones	53
VII.	ANEXO I	56
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68

I. INTRODUCCION

La importancia de la calidad de los medicamentos es un tema que no se pone a discusión. En general, la situación actual del control de calidad de los medicamentos puede considerarse satisfactoria, ya que se dispone de varias herramientas para el control y el aseguramiento de la calidad, tales como las Buenas Prácticas de Laboratorio, las Buenas Prácticas de Manufactura y de las verificaciones analíticas de los procedimientos involucrados en la manufactura del producto; así mismo la validación de métodos analíticos permite la obtención de resultados confiables durante el análisis de medicamentos.

En lo que a verificaciones analíticas se refiere, la metodología empleada para controlar procesos y productos ha venido avanzando a grandes pasos, científica y tecnológicamente. A pesar de ésto, no debe olvidarse que un resultado analítico sólo nos acerca al valor verdadero. Por esta razón, una validación adecuada de la metodología permite conocer sobre qué margen de error se está trabajando y "controlar" dicho error.

Así como se entiende y se acepta que un buen producto es el resultado de un buen proceso y que ambos deben ser probados y controlados para asegurar la calidad final. De la misma manera, dentro del aseguramiento de la calidad en el

laboratorio, los métodos analíticos y procedimientos, constituyen el proceso que debe ser controlado para asegurar la calidad de los resultados, lo cual se logra a través de la validación.

La validación de métodos analíticos verifica en forma documentada, que la metodología propuesta esté basada en principios científicos adecuados y que cumpla con los propósitos prácticos de medición para los cuales ha sido optimizada. Como consecuencia, la validación de métodos analíticos permite asegurar la aceptación y utilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Los métodos analíticos descritos en varias Farmacopeas como: la USP, NF, Martindale y otras más, no requieren validar la exactitud y confiabilidad de estos métodos, sino solamente verificar su adaptabilidad bajo sus condiciones de operación. Sin embargo, otras fuentes han argumentado que los métodos establecidos en medios oficiales deberán validarse igualmente, ya que nuevas condiciones de operación, reactivos, instrumentos y personal, pueden alterar sus características.

Así mismo, se tiene la experiencia de que los métodos compendiales descritos en las Farmacopeas, no producen los mismos resultados en productos que tengan el o los mismos principios activos, pero con diferente formulación, por lo que es necesaria la validación analítica para cada producto.

En el presente trabajo, se describe el desarrollo y la validación de un método de análisis para cuantificar Acetato de Prednisolona, un fármaco de naturaleza esteroide con propiedades antiinflamatorias, formulado en la forma farmacéutica de suspensión, con una dosificación de 500 mg/100 mL, destinada para uso oftálmico.

El fundamento de la metodología seguida, está basado en las propiedades fisicoquímicas de los principios activos; se separó el Acetato de Prednisolona de los demás componentes de la formulación por procesos de extracción líquido-líquido. Se diluyó convenientemente y posteriormente se procedió al desarrollo del color en medio cloroformico, utilizando solución de Hidróxido de Tetrametilamonio para alcalinizar el medio y solución de Azul de Tetrazolio, el cual reacciona con el esteroide reduciéndose cuantitativamente para producir un compuesto colorido, cuya concentración se mide en un espectrofotómetro adecuado a una $\lambda = 525 \text{ nm}$.

La FEUM 6a Ed. describe un método para valoración de esteroides totales que presentan en su estructura grupo α -Cetol, basado en el mismo principio. Sin embargo, en el método propuesto se hicieron modificaciones en cuanto al disolvente utilizado en las soluciones en las que se desarrolla color y al tiempo y la temperatura de reacción, ya que en la FEUM 6a Ed., se indica que debe trabajarse a 25 °C y que se determinen las absorbancias 90 minutos después de adicionar la solución de Hidróxido de Tetrametilamonio. En el método propuesto, se trabaja a temperatura ambiente y las lecturas espectrofotométricas se realizan 30 minutos después de agregar el reactivo.

II. OBJETIVOS

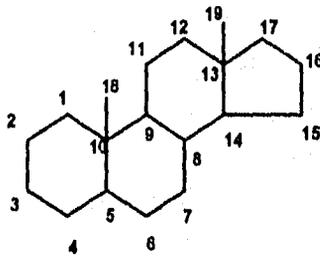
- Desarrollar un método analítico para determinar Acetato de Prednisolona en una suspensión oftálmica que también contiene Cloramfenicol.
- Validar el método analítico desarrollado, evaluando cada uno de los siguientes parámetros: Especificidad del Método, Linealidad, Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad), Exactitud y Estabilidad de la muestra analítica.
- La validación implicará verificar que los resultados obtenidos demuestren que el método de análisis es confiable y aplicable para el control de calidad del producto farmacéutico.

III. GENERALIDADES

El principio activo analizado (acetato de prednisolona), químicamente es un esteroide, por lo que a continuación se presentan generalidades sobre este tipo de sustancias.

III.1 CORTICOESTEROIDES

Las hormonas esteroideas se derivan de una estructura orgánica cíclica compleja conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno, la cual, con la adición de dos grupos metilo angulares (carbono 18 y 19) pasa a ser la estructura cíclica básica de los esteroides.⁽¹⁾



Los esteroides naturales son sintetizados en las glándulas suprarrenales, las cuales están constituidas de dos partes diferentes: la médula y la corteza.⁽³⁾

Dentro de los esteroides sintetizados por la corteza suprarrenal, se encuentran los corticoesteroides con 21 átomos de carbono, en los que se incluyen otras sustancias químicas sintéticas que son capaces de producir efectos fisiológicos esencialmente similares, y los andrógenos con 19 átomos de carbono.^(1,3)

CLASIFICACION Y ACCION FARMACOLOGICA

Con base en las diferentes respuestas observadas con relación a la retención de sodio (Na^+) y el depósito de glucógeno hepático, los corticoesteroides se han clasificado tradicionalmente en dos grupos: los mineralocorticoides y los glucocorticoides.⁽³⁾

Mineralocorticoides⁽³⁾

Los mineralocorticoides están involucrados en la retención de iones sodio (Na^+) en el fluido extracelular y de iones potasio (K^+) dentro de la célula, estableciendo así, la distribución normal de agua y de iones cloruro (Cl^-), lo cual da como resultado el mantenimiento del volumen y presión sanguíneos. Su regulación y funcionamiento están estrechamente relacionados con el sistema renina-angiotensina y tiene gran importancia en la clínica de la hipertensión.

Glucocorticoides⁽³⁾

Los glucocorticoides aumentan la glucemia y el glucógeno hepático, por estímulo de la gluconeogénesis a expensas de proteínas; promueven la movilización de ácidos grasos y el catabolismo proteico. También tienen efectos importantes sobre el sistema hematopoyético, haciendo decrecer el número de linfocitos,

eosinófilos y basófilos, mientras que aumentan el número de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos.

Los glucocorticoides parecen afectar a todas las células, aunque no de la misma manera. El interés se enfoca principalmente a sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores.^(1,3,4)

Dichos efectos de los glucocorticoides están estrechamente ligados, porque son el resultado de la inhibición de algunas funciones específicas de los leucocitos. En varios casos, estos efectos sobre los leucocitos son una consecuencia de la inhibición inducida por los glucocorticoides sobre la producción y/o la acción de las linfocinas.⁽³⁾

Acciones Antiinflamatorias

La cortisona y la hidrocortisona fueron los primeros corticoesteroides usados por su acción antiinflamatoria.⁽¹⁾

Los glucocorticoides tienen la capacidad de prevenir o suprimir el desarrollo de las manifestaciones de la inflamación. Inhiben la respuesta inflamatoria, cualquiera que sea el efecto causal: radiante, mecánico, químico, infeccioso o inmunológico.⁽³⁾

Los corticoesteroides inhiben no sólo los fenómenos tempranos del proceso inflamatorio (edema, depósito de fibrina, dilatación capilar, migración de leucocitos hacia el área inflamada y actividad fagocitaria), sino que también las manifestaciones tardías (proliferación de fibroblastos, depósito de colágeno y aún más tarde, cicatrización).⁽³⁾

La supresión de la inflamación por parte de los glucocorticoides, se debe a la capacidad que presentan para inhibir el reclutamiento de leucocitos y monocitos-macrófagos en las áreas afectadas, inhibiendo la capacidad de estas células para elaborar

diversas sustancias quimiotácticas, así como factores que intervienen en la mayor permeabilidad capilar, vasodilatación y contracción de diversos músculos lisos no vasculares.⁽³⁾

Las investigaciones posteriores sobre los glucocorticoides han llevado al desarrollo de nuevos esteroides que tienen una potencia antiinflamatoria muy superior a la cortisona; entre ellos se encuentran: Prednisolona, Metilprednisolona, Dexametasona, etc.⁽⁴⁾

Acciones Inmunosupresoras

Los glucocorticoides también son muy valiosos para el tratamiento de enfermedades que resultan de reacciones inmunes indeseables. Estas enfermedades varían desde condiciones que son el resultado de la inmunidad humoral, como la urticaria, hasta aquellas mediadas por mecanismos de inmunidad celular como el rechazo de transplantes de órganos.

Si bien los glucocorticoides no eliminan los estados de inmunidad humoral o celular, sí impiden sus manifestaciones. Hasta el momento, la mayoría de las acciones estudiadas implican la destrucción de la comunicación intracelular entre los leucocitos a través de la interferencia con la producción o las funciones de las linfocinas.⁽³⁾

METODOS DE ANALISIS

En la actualidad se dispone de una gran variedad de técnicas analíticas para el análisis cuantitativo de corticoesteroides, entre las cuales se encuentran separaciones cromatográficas, determinaciones espectrofotométricas y electroquímicas. A continuación se describen brevemente los métodos más utilizados en la cuantificación de corticoesteroides en diversos productos farmacéuticos.

A. Métodos Cromatográficos⁽²⁴⁾

Los métodos cromatográficos a diferencia de otros métodos físicos y químicos de separación, consisten en que entran en contacto dos fases mutuamente inmiscibles, siendo una de ellas estacionaria y la otra móvil. La muestra que se pone en contacto con la fase móvil, produce una serie de interacciones (particiones) repetitivas entre la fase estacionaria y la fase móvil basadas en la diferencia de propiedades físicas y químicas de los componentes de la muestra.

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, existen diferentes métodos cromatográficos para la cuantificación de corticoesteroides en productos farmacéuticos como: la cromatografía de líquidos de alta resolución y la cromatografía en capa delgada, aunque ésta última ha sido muy utilizada cualitativamente como un paso previo para la separación en placa y posteriormente la cuantificación por espectrofotometría ultravioleta o visible.

B. Métodos Espectrofotométricos

Los métodos espectrofotométricos permiten realizar el análisis de los corticoesteroides tanto cualitativa como cuantitativamente, por medio de las espectrofotometrías ultravioleta, visible e infrarroja.

Espectrofotometría Visible y Ultravioleta⁽²⁵⁾

Cuando las moléculas interactúan con la energía radiante en la región ultravioleta (190-380 nm) o visible (380-780 nm), la absorción de energía consiste en el desprendimiento de un electrón externo de la molécula. En los compuestos no saturados, la absorción resulta en el desprendimientos de electrones π . Las

moléculas que contienen grupos absorbentes simples llamados cromóforos, presentan transiciones a longitudes de onda características.

La mayoría de las valoraciones espectrofotométricas en la región visible, lo mismo que en la región ultravioleta, suelen requerir la comparación simultánea de la absorbancia producida por la muestra problema con la producida por una solución patrón que contenga aproximadamente la misma cantidad de una sustancia de referencia (S. Ref.), tratada de la misma manera. En algunos casos en lugar de utilizar solución de sustancia de referencia, se efectúa la comparación tomando como referencia, el valor del $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ de la sustancia que se analiza en las condiciones de la determinación.

Espectrofotometría Infrarroja^(24,25)

La región infrarrojo del espectro electromagnético se extiende desde el extremo rojo al final del espectro visible, hasta las microondas. La espectrofotometría infrarroja implica movimientos de torsión, flexión, rotación y vibración de los átomos de una molécula al interactuar con la radiación infrarroja, estos movimientos dependen de las características de los grupos funcionales constitutivos de la molécula, así como de la configuración total de los átomos.

La espectrofotometría infrarroja es usada más a menudo en forma cualitativa para la identificación de corticoesteroides, también se ha empleado para análisis cuantitativo pero a menudo pueden hallarse otros procedimientos más precisos o más cómodos.

C. Métodos Polarográficos^(24,25)

Polarografía

La polarografía es un método electroquímico de análisis basado en la medida del flujo de corriente que se produce por la electrólisis de una solución en un microelectrodo polarizable, se grafica la curva corriente-voltaje (polarograma) donde existe una meseta en la cual la corriente es proporcional a la concentración de la sustancia reducible en la solución. Empleando una curva de calibración adecuada, se puede determinar la concentración de la sustancia reducible. El polarograma obtenido proporciona información cualitativa y cuantitativa de sustancias electroreducibles y electrooxidables. Una de las características que tiene éste método es la posibilidad de detectar concentraciones de 10^{-2} a 10^{-5} molar.

III.2 MONOGRAFIA DE ACETATO DE PREDNISOLONA

NOMBRES ^(6,7,8,9)

Químico: 21-Acetoxi-11 β , 17 α -dihidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona

Pregna-1,4-dieno-3,20-diona,21-(acetiloxi)-11,17-dihidroxi-,(11 β)-

11 β ,17,21-Trihidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona 21-acetato

Prednisolona 21-acetato

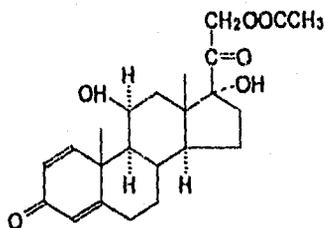
Genérico: Acetato de prednisolona

Registrados: Encopred, Pred Mild, Pred Forte, Inflanefran.

ESTRUCTURA QUIMICA ⁽⁵⁾

C₂₃H₃₀O₆

M.M. 402.49



PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

Descripción ⁽⁵⁾

Polvo cristalino blanco o prácticamente blanco, inodoro.

Temperatura de fusión ⁽⁵⁾

Funde a 235° C, con descomposición.

Solubilidad ^(5,6,9)

Soluble en alcohol , ligeramente soluble en cloroformo y acetona, prácticamente insoluble en agua.

ENSAYOS DE IDENTIDAD

A. Espectroscopía infrarroja ^(5,7)

El espectro de absorción en la región infrarroja, de una dispersión en bromuro de potasio de la muestra previamente seca, exhibe máximos únicamente a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de la sustancia de referencia de acetato de prednisolona.

B. Espectroscopía ultravioleta ^(5,7)

El espectro de absorción en la región ultravioleta de una solución (1:100000) de la muestra en metanol, exhibe máximos y mínimos únicamente a las mismas longitudes de onda que una solución similar de la sustancia de referencia de acetato de prednisolona y las respectivas absorptividades calculadas con referencia a las sustancias secas, a longitudes de onda de máxima absorbancia de cerca de 242 nm aproximadamente, no difieren en más de 2.5 %.

C. Reacción química

C.1 Acetatos ^(5,7)

A 50 mg de la muestra de acetato de prednisolona contenidos en un tubo de ensayo, agregar 2.0 mL de alcohol y 2.0 mL de ácido sulfúrico diluido (1:3.5), calentar a ebullición suave durante 10 minutos. Se percibe el olor a acetato de etilo.

C.2 Prednisolona ⁽⁶⁾

Disolver una pequeña cantidad de la muestra en 1 ml de ácido sulfúrico, por lo cual se obtiene una coloración rojo vino; después de reposar por 1 minuto la solución exhibe un color amarillo fluorescente en luz ultravioleta.

D. Rotación específica ⁽⁷⁾

La rotación específica (base seca), de una solución en dioxano que contiene 100 mg/ 10 mL se encuentra entre +112 ° y +119 °.

VALORACION

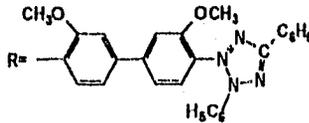
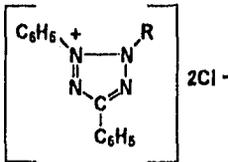
Contiene no menos del 97.0 % y no más del 102.0 % de acetato de prednisolona, calculado con referencia a la sustancia seca.⁽⁵⁾

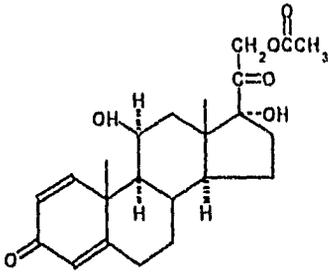
Entre los métodos reportados en la literatura para la valoración de corticoesteroides, el más utilizado es el que emplea al azul de tetrazolio (procedimiento de Mader y Buck)⁽¹⁰⁾, y actualmente tras algunas modificaciones, se ha convertido en el método farmacopeico oficial (FEUM 6 ed.), para la valoración de esteroides totales que posean grupos funcionales reductores del tipo alfa-cetol. (5,10,11,12,13,17)

El fundamento del método es el siguiente:

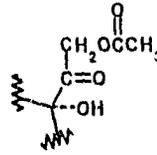
El acetato de prednisolona, en soluciones fuertemente alcalinas (por la presencia de hidróxido de tetrametilamonio), reacciona con el azul de tetrazolio, el cual oxida al grupo alfa cetol de la cadena lateral del C-17 de los corticoesteroides y se reduce cuantitativamente para producir un compuesto colorido llamado rojo de formazán cuya concentración se mide espectrofotométricamente a una $\lambda = 525 \text{ nm}$. (5,10,11,12,13)

Azul de Tetrazolio

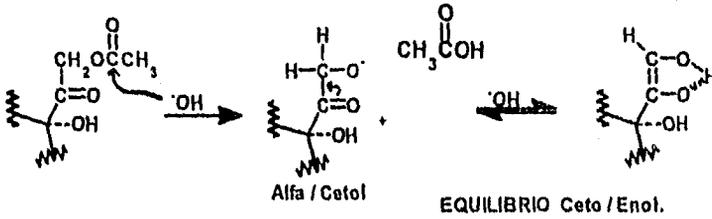




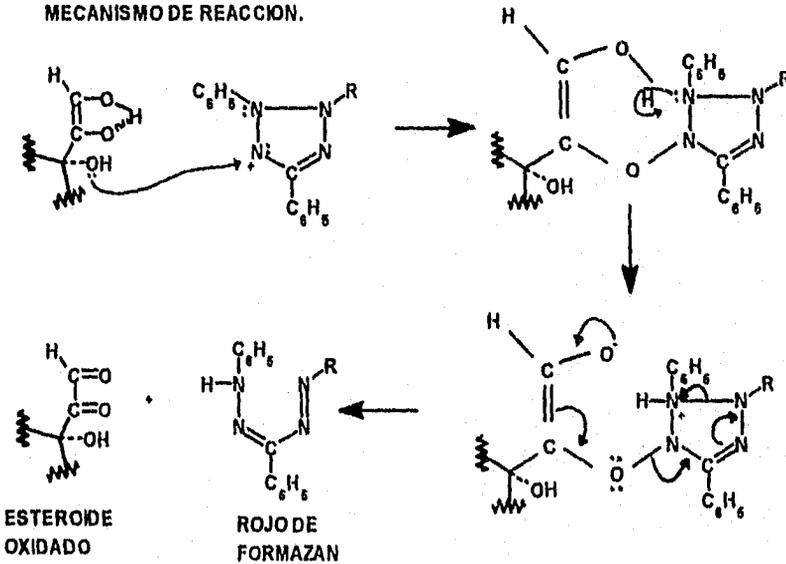
ACETATO DE PREDNISOLONA



Cadena Lateral del C-17



MECANISMO DE REACCION.



INDICACIONES TERAPEUTICAS ⁽¹⁴⁾

Se utiliza en el tratamiento de enfermedades oftálmicas.

Se emplea para tratar alteraciones inflamatorias de párpados, conjuntiva, córnea y segmento anterior del globo ocular. También en heridas o lesiones de la córnea, por quemaduras térmicas o por productos químicos.

La combinación de acetato de prednisolona y antibacterianos suele emplearse cuando se requieren ambas acciones, antiinflamatoria y antiinfecciosa como: queratitis marginal secundaria, infección estafilocócica, blefarconjuntivitis, conjuntivitis alérgica, conjuntivitis bacteriana crónica y en algunos casos de inflamación postoperatoria.

FARMACOCINETICA ^(3,6,9,14)

Los glucocorticoides como el acetato de prednisolona se absorben en sitios de aplicación local como espacios sinoviales , saco conjuntival y piel. La absorción a través de la membrana de la córnea intacta es mínima. Por lo general las suspensiones se absorben con mayor facilidad que las soluciones.

En condiciones normales se une más del 90 % a dos proteínas plasmáticas: la globulina fijadora de corticoesteroides y la albúmina.

El acetato de prednisolona libre, es biológicamente activo y se encuentra disponible para ser metabolizado principalmente en el hígado y ser excretado en la orina en forma libre y conjugado con sus metabolitos. Normalmente la excreción de prednisolona y sus metabolitos es completa después de tres días de su administración.

El acetato de prednisolona posee una vida media biológica intermedia de 12-36 horas.

CONTRAINDICACIONES ^(3,14)

El uso de acetato de prednisolona está contraindicado en infecciones agudas de herpes simple superficial (queratitis dendrítica), infecciones purulentas no tratadas; vaccinia, varicela, tuberculosis ocular y otras enfermedades oculares causadas por hongos o virus.

Debe usarse con cuidado en abrasiones de la córnea, ya que por lo general se presentan contaminaciones especialmente causadas por herpes.

No debe emplearse tópicamente en el tratamiento de laceraciones y abrasiones mecánicas del ojo.

EFFECTOS SECUNDARIOS ^(14,15)

Aumento de la presión intraocular, especialmente en personas ancianas; adelgazamiento de la córnea, aumento de la susceptibilidad a infección de la córnea por virus y hongos, ulceración corneal.

Con el uso prolongado o excesivo, se puede favorecer la aparición de glaucoma, cataratas, defectos de la agudeza y campo visual, lesión del nervio óptico.

Puede provocar ardor en el momento de la instilación

DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION ^(14,16)

Vía de administración: Oftálmica

Dosis: Refiriéndose a suspensión con 500 mg/100 mL:
Aplicar de 3 a 4 gotas en el saco conjuntival, 3 a 4 veces al día durante 3 a 5 días.

En casos severos 1 gota cada hora durante el día y durante la noche 1 gota cada 2 horas. Cuando la respuesta sea favorable, la dosis deberá reducirse a 1-2 gotas cada 3-12 horas.

PRESENTACION FARMACEUTICA ⁽¹⁵⁾

Suspensión oftálmica (colirio)	500 mg/ 100 mL
Unguento oftálmico	500 mg/100 g

EMPAQUE Y ALMACENAMIENTO ^(7,16)

Conservar en recipientes bien cerrados y protegidos de la luz.

III.3 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de un método analítico constituye solo una parte del amplio programa de validación que involucra: proveedores, proceso, personal, áreas, sistemas y todos aquellos factores que de una manera u otra participan en la elaboración de productos que cumplan con el objetivo principal que es la "calidad".⁽¹⁸⁾

En lo que se refiere a la calidad de los medicamentos, es muy importante verificar la metodología empleada para controlar procesos y productos, así como aquella que se emplea en el análisis rutinario de las formas farmacéuticas, y ésto sólo se logra con el proceso de la validación.⁽¹⁸⁾

La USP y la Ley General de Salud, han servido como base regulatoria, donde ésta última menciona que el control aplicado a cualquier preparado farmacéutico debiera comprobarse y validar cualquier técnica empleada para éste fin. Con esta regulación, las autoridades sanitarias del Sector Salud, exigen la validación de métodos analíticos.⁽¹⁹⁾

La validación de métodos analíticos se define como la evidencia documentada por estudios de laboratorio, de que las características del comportamiento del método, satisfacen los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.⁽⁷⁾

La información que se requiere para la validación de un método analítico depende de la aplicación deseada y con base a ésta, los procedimientos de ensayo se han clasificado en las siguientes categorías ⁽⁷⁾ :

categoría I. Métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes de un medicamento o de los principios activos (incluyendo conservadores), en productos farmacéuticos terminados.

categoría II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas en medicamentos o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas límites.

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

Para cada una de estas categorías los requisitos de validación son diferentes. En la tabla I se presentan los parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos, basándose en las categorías mencionadas.

tabla 1.
Parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos

PARAMETRO	CATEGORIA			
	I	II		III
		CUANTITATI VA	PRUEBA LIMITE	
Precisión	sí	sí	no	sí
Exactitud	sí	sí	*	*
Límite de detección	no	no	sí	*
Límite de cuantificación	no	sí	no	*
Especificidad	sí	sí	sí	*
Intervalo	sí	sí	*	*
Linealidad	sí	sí	no	*
Tolerancia	sí	sí	sí	sí

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

La validación incluye efectuar pruebas para:

1) Sistema (Las determinaciones se realizan con soluciones de la sustancia que se analiza). Se evalúa:

Linealidad
Precisión (Repetibilidad)

2) Método (Las determinaciones se realizan con muestras que contienen todos los componentes de la formulación). Se evalúa:

Especificidad
Linealidad
Exactitud
Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)
Estabilidad de la muestra analítica

Según Hokanson⁽²¹⁾, los parámetros de validación se dividen con base en las características que evalúan el comportamiento del método:

1. Parámetros que evalúan la adecuabilidad del sistema:

Especificidad
Linealidad

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

Exactitud

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

Precisión

DEFINICIONES:

Las definiciones de los parámetros de validación, así como la forma de evaluarlos y los criterios de aceptación mencionados a continuación, están enfocados a la validación de métodos analíticos químicos y espectrofotométricos.

ESPECIFICIDAD.

Definición: (Para métodos indicadores de Control de Calidad)

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra, que estén presentes en la formulación.

Determinación:

Con el método propuesto:

Analizar placebos del producto que contengan todos los componentes de la formulación excepto el principio activo que se analiza.

Criterio de aceptación:

Determinar que el método desarrollado es capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia que puedan provocar los demás componentes de la formulación.

LINEALIDAD*

Definición:

Es la capacidad de un método que permite asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien, mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo.

* Los cálculos se presentan en el anexo I.

Determinación:

Cuando se trabaja con el sistema se analizan soluciones que contienen solamente la sustancia de referencia , en tanto que, cuando se trabaja con el método se analizan muestras que contienen todos los componentes de la formulación.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida), utilizando para el sistema cuando menos cinco concentraciones diferentes, preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis por duplicado para cada concentración. Para el método, cuando menos tres concentraciones diferentes y haciendo el análisis por triplicado para cada concentración.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; ya sea para control de calidad o de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración de 100 %. Generalmente se recomienda la separación de concentraciones en un 20- 25 %.

La linealidad se expresa generalmente en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la recta ajustada (línea de regresión), calculada a partir de una relación matemática con los resultados del análisis de muestras con concentraciones variables y conocidas de la sustancia. La relación matemática que describe la ecuación de la recta es la siguiente:

$$y = m x + b$$

En donde:

y = respuesta medida

m = pendiente de la recta

x = concentración

b = ordenada al origen

Calcular:

- La pendiente de la recta (m).
- La ordenada al origen (b).

Para conocer si los valores de la pendiente (m) y de la ordenada al origen (b) que se obtienen experimentalmente, son estadísticamente diferentes a los valores considerados como teóricos, se aplica la prueba de t y se establecen los límites de confianza para (m) y para (b).

- Coeficiente de correlación (r).
- Coeficiente de determinación (r^2).

El coeficiente de determinación de la relación lineal simple debe ser mayor o igual a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple no debe ser estadísticamente significativa. Esto es, los datos de la curva de calibración se sujetan a un análisis de varianza en donde los parámetros de evaluación son las F resultantes de la distribución y tratamiento de datos.

Criterios de aceptación:

1. La pendiente (m) de la línea de regresión debe ser estadísticamente igual a 1.

1.1 Si $|t_{cal}| < t_{tab}(n-2, 0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la pendiente que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente de 1.

2. La ordenada al origen (b) de la línea de regresión debe ser estadísticamente igual a cero.

2.1 Si $|t_{cal}| < t_{tab}(n-2, 0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la ordenada al origen que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente de 0.

3. El coeficiente de correlación (r) debe ser ≥ 0.99
4. El coeficiente de determinación (r^2) debe ser ≥ 0.98
- 4.1 Si $F_r \geq F$ (g.l.r.,g.l.er.; α 0.01), entonces existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.
- 4.2 Si $F_{fa} > F$ (g.l.fa.,g.l.ep.; α 0.05), entonces existe falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada, propiedad medida.

PRECISION

Definición:

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

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

La precisión se evalúa como:

REPETIBILIDAD*

Definición:

Evalúa la precisión y se expresa como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes de una misma preparación, realizadas bajo las mismas condiciones experimentales (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

* Los cálculos se presentan en el anexo I.

Determinación:

El análisis se realiza por sextuplicado de una misma preparación (soluciones de referencia en "sistema" y producto que se está analizando en "método"), correspondientes al 100 %, que generalmente debe ser el punto medio de las curvas de linealidad del sistema y del método.

Calcular:

El coeficiente de variación total (CV)

Criterio de aceptación:

El coeficiente de variación debe ser ≤ 1.5 % para el sistema y ≤ 3.0 % para el método.

REPRODUCIBILIDAD***Definición:**

Evalúa la precisión del método analítico y manifiesta la concordancia entre determinaciones independientes de una muestra homogénea del material que se esté analizando bajo diferentes condiciones experimentales, por lo cual, las pruebas se realizan en distintos días y con diferentes analistas y/o equipos.

Determinación:

Se determina en forma independiente y por triplicado para cada analista y en cada día, empleando una muestra homogénea del material que se analiza.

Los análisis se realizan en dos días y por dos analistas; el placebo se carga al 100 %, que debe ser el punto medio de las curvas de calibración de linealidad.

* Los cálculos se presentan en el anexo I.

Calcular:

El coeficiente de variación total (CV).

Los resultados de reproducibilidad se sujetan a un diseño factorial de dos factores o dos niveles y a un tratamiento estadístico de análisis de varianza para obtener el coeficiente de variación total; donde se generan las F correspondientes a las dos fuentes de variación analítica: días y analistas.

Criterios de aceptación:

En la reproducibilidad, el dato que se calcula es el coeficiente de variación total, que debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado. En este caso, el método es espectrofotométrico, con un coeficiente de variación $\leq 3.0\%$

Si $F_{analista} < F_{analista} (g.l.a., g.l.d.; 0.05)$; El método es reproducible por los analistas.

Si $F_{día} < F_{día} (g.l.d., g.l.a-d.; 0.05)$; El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

EXACTITUD AL 100 % ***Definición:**

La exactitud de un método analítico se define como la concordancia entre el valor promedio obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

* Los cálculos se presentan en el anexo I.

Determinación:

El análisis se realiza por sextuplicado de una muestra de placebo adicionada de una concentración conocida de la sustancia que se cuantifica, simulando las condiciones de la muestra. La concentración resultante de estas preparaciones debe ser del 100 %, y deben prepararse de manera independiente. Se cuantifican contra una preparación de la sustancia de referencia.

Calcular:

La exactitud se evalúa por medio del modelo probabilístico " t de Student " y el cálculo del intervalo de confianza para la media y/o a través del cálculo del coeficiente de variación para el por ciento de recobro.

Criterios de aceptación:

El método de medición es exacto si cumple con los siguientes criterios:

1. Si $|t \text{ cal} | < t \text{ tab } (n-2, 0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 100 %, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la media que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente del 100 %.
2. El valor del coeficiente de variación para el por ciento de recobro, debe de ser $\leq 3.0 \%$ para técnicas espectrofotométricas.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA*

Definición:

Mediante este análisis, se pretende conocer las condiciones en las cuales el proceso de análisis, mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado. Este proporciona una mayor confiabilidad en los resultados, pues se comprueba que no presentan degradación, antes de medir su respuesta para ser cuantificada.

Determinación:

El estudio de estabilidad de las soluciones analíticas, se realiza en la forma siguiente: las soluciones analizadas previamente, se almacenan en diferentes condiciones, por ejemplo, en refrigeración, en la oscuridad, a temperatura ambiente y en presencia de luz blanca. Posteriormente se vuelven a analizar en determinados tiempos establecidos.

Calcular:

Los resultados obtenidos se tabulan con base en el formato del anexo I.

Criterio de aceptación:

La media del factor (I) para cada condición/tiempo se debe encontrar entre los valores de 97.0 y 103.0 %.

* Los cálculos se presentan en el anexo I.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Aplicación del método analítico, para cuantificar Acetato de Prednisolona contenido en la forma farmacéutica (suspensión, de uso oftálmico) que se analiza y que presenta la siguiente formulación:

Cloramfenicol Levógiro	100 mg
Acetato de Prednisolona	500 mg
Vehículo c.b.p.	100 ml

Límites Farmacopeicos:

Contiene no menos del 90.0 % y no más del 115.0 % de la cantidad indicada en el marbete de Acetato de Prednisolona.

IV.1 DESARROLLO DEL METODO ANALITICO

a. Reactivos

- * Solución de Azul de Tetrazolio (0.5 % p/v en Metanol)
- * Solución de Hidróxido de Tetrametilamonio (10 % v/v en Metanol)
- * Cloroformo R.A

b. Preparación de la Solución de Referencia

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Acetato de Prednisolona, sustancia de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar aproximadamente 70 mL de Cloroformo R.A. y agitar hasta disolución, llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar el contenido del matraz. Transferir una alícuota de 5.0 mL a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al volumen con Cloroformo R.A. y mezclar. Transferir una alícuota de 10.0 mL a un matraz volumétrico de 25 mL, (en esta muestra se desarrolla el color).

c. Preparación de la solución de la muestra Problema

Transferir a un embudo de separación una cantidad de muestra equivalente a 0.005 g de Acetato de Prednisolona (1 mL) y efectuar tres extracciones con porciones de 30 mL de Cloroformo c/u. Reunir los extractos clorofórmicos en un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al volumen con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar a través de papel filtro, desechar los primeros mililitros del filtrado y transferir una alícuota de 2.0 mL a un matraz volumétrico de 25 mL, (en esta muestra se desarrolla el color).

d. Procedimiento (Desarrollo de Color)

Ajustar los volúmenes de la alícuotas contenidas en los matraces correspondientes a la solución de la sustancia de referencia y de la solución problema, a 20 mL con Cloroformo R.A.. Transferir 20 mL de Cloroformo R.A. a otro matraz de 25 mL y marcarlo como "Blanco". Proceder con los tres matraces como a continuación se indica:

- * Agregar 2 mL de la solución de Azul de Tetrazolio.
- * Agregar 2 mL de la solución de Hidróxido de Tetrametilamonio, marcando con un cronómetro cuando se realice este paso.
- * Llevar al volumen con Cloroformo y mezclar.
- * Colocar los matraces en la oscuridad.

Determinar las absorbancias de cada solución en un espectrofotómetro adecuado, a 525 nm, utilizando Cloroformo como blanco de referencia. Las absorbancia se determinarán en cada caso, después de haber transcurrido 30 minutos exactos, desde la adición de la solución de Hidróxido de Tetrametilamonio.

e. Cálculos

Calcular el contenido de Acetato de Prednisolona por cada 100 mL de suspensión, aplicando la siguiente formula:

$$\text{mg de Acetato de Prednisolona. / 100 mL} = \frac{\frac{\text{Ap} - \text{Abl}}{\text{Aref} - \text{Abl}} \times \text{C} \times \text{F} \times 100}{\text{M}}$$

En donde:

- Ap = Absorbancia de la solución de la muestra problema.
- Aref = Absorbancia de la solución de la sustancia de referencia.
- Abl = Absorbancia de la solución del blanco.
- C = Concentración en la solución final, de la sustancia de referencia, expresada en mg/mL.
- F = Factor de dilución de la muestra.
- M = Muestra utilizada en el análisis expresada en mg.

IV.2 VALIDACION DEL METODO ANALITICO

La evaluación de los parámetros para validar el método analítico, se realizó de la siguiente manera:

a. Especificidad

Se efectuó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitudes de onda entre 450 y 600 nm de las siguientes muestras:

- Solución de la Sustancia de Referencia
- Solución de la Muestra Problema
- Solución del Placebo

b. Linealidad del Sistema

Se prepararon soluciones de Acetato de Prednisolona, Sustancia de Referencia, en cinco diferentes concentraciones (80, 90, 100, 110 y 120 %) de la cantidad de Acetato de Prednisolona, expresada en el marbete de la suspensión oftálmica que se analiza. Cada una de las concentraciones se analizó por duplicado.

c. Repetibilidad de Sistema

Este parámetro se evaluó analizando seis diferentes muestras de soluciones preparadas con Acetato de

Prednisolona, Sustancia de Referencia, correspondiente al 100 % de la cantidad expresada en el marbete, de la suspensión oftálmica que se analiza.

d. Linealidad del Método

Se analizaron muestras de placebos adicionados con Acetato de Prednisolona, Sustancia de Referencia, en concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120 % de la cantidad expresada en el marbete, de la suspensión oftálmica. Cada placebo cargado se analizó por triplicado.

e. Exactitud del Método

Se efectuó analizando seis muestras diferentes de placebos, adicionados con Acetato de Prednisolona, Sustancia de Referencia, en una concentración del 100 % de la cantidad expresada en el marbete, de la suspensión oftálmica. Se compararon los porcentajes de la cantidad encontrada, con los porcentajes adicionados de dicha sustancia de referencia.

f. Repetibilidad del Método

Se analizaron seis muestras diferentes de un placebo al que se le adicionó Acetato de Prednisolona, Sustancia de Referencia, en una concentración del 100 % de la cantidad expresada en el marbete de la suspensión oftálmica.

g. Reproducibilidad del Método

Dos analistas realizaron por triplicado, en días diferentes, la valoración, en muestras de un placebo al que se le adicionó Acetato de Prednisolona, Sustancia de Referencia, en una concentración del 100 % de la cantidad expresada en el marbete, de la suspensión oftálmica.

h. Estabilidad de la muestra analítica

Para evaluar este parámetro, se analizaron tres muestras analíticas de un placebo al que se le adicionó Acetato de Prednisolona, Sustancia de Referencia, en una concentración que corresponde al 100 % de la cantidad expresada en el marbete. Dichas soluciones se prepararon como se indica en "preparación de la solución problema", y se mantuvieron bajo las siguientes condiciones:

- Luz blanca
- Refrigeración
- Oscuridad

Se desarrolló el procedimiento analítico para cuantificar el Acetato de Prednisolona, en las soluciones recién preparadas y después de 3 y 24 horas de mantener las muestras en las condiciones señaladas.

También se determinó la estabilidad de la muestra después de desarrollar color, realizando la lectura en el espectrofotómetro después de 60 minutos de haber agregado la solución de Hidróxido de Tetrametilamonio, a las muestras recién preparadas.

V. RESULTADOS

Especificidad

No obstante que el método analítico propuesto, indica utilizar Cloroformo como blanco de referencia; para este parámetro se utilizó el blanco con los reactivos como referencia, para así obtener directamente los espectros de absorción reales de la Sustancia de Referencia, de la Muestra Problema y del Placebo (Cloramfenicol y Vehículo), sin la sustancia de interés.

En la tabla No. 1 se presentan los resultados de las muestras analizadas para evaluar este parámetro.

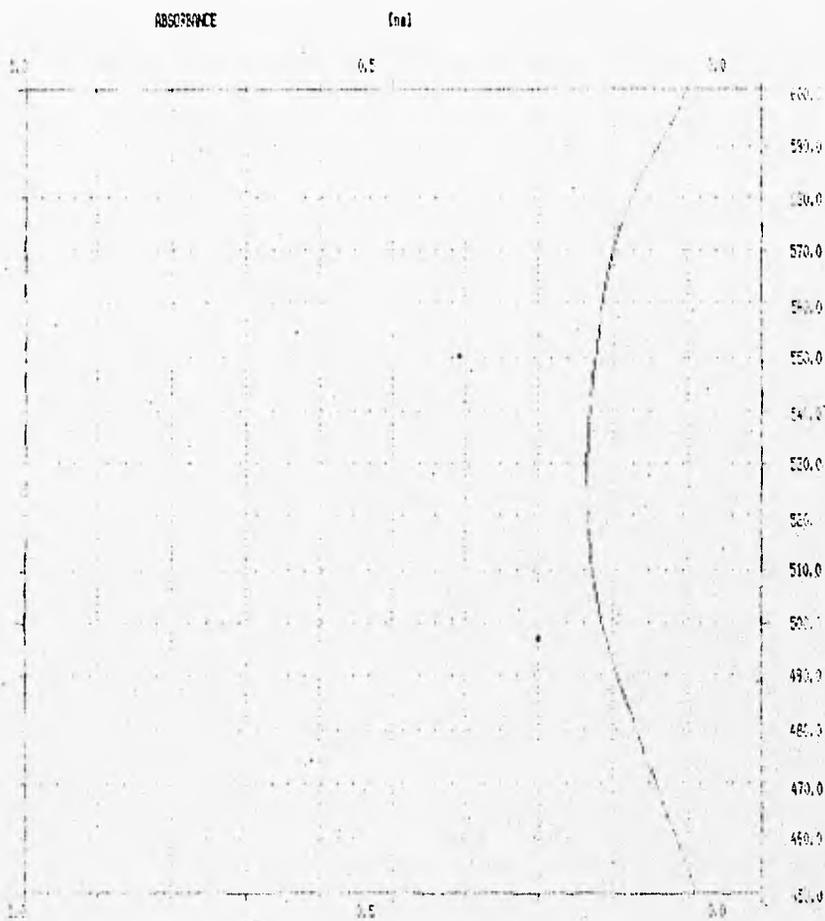
Tabla No. 1

	Absorbancia a $\lambda = 525 \text{ nm}$
Acetato de Prednisolona (Sustancia de Referencia)	0.241
Muestra problema (Suspensión Oftálmica)	0.237
Placebo sin cargar (Cloramfenicol y Vehículo)	Despreciable

A continuación se presentan los espectros de absorción correspondientes a: Acetato de Prednisolona (Sustancia de Referencia), fig. No. 1 ; Muestra Problema, fig. No. 2 ; Placebo, fig. No. 3 .



Figura No. 1
ACETATO DE PREDNISOLONA
Sustancia de Referencia



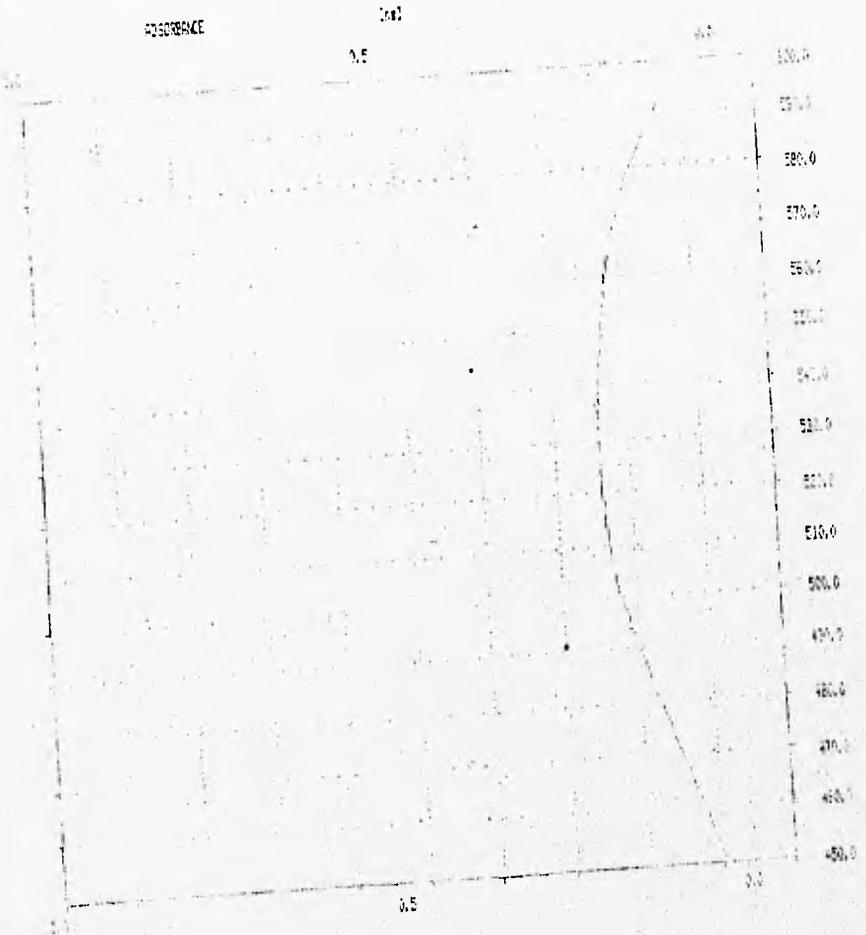
THRESHOLD : 0.100

BATCH: 992

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	20157	528.7 nm (MAX)	0.237 ABS



Figura No. 2 MUESTRA PROBLEMA



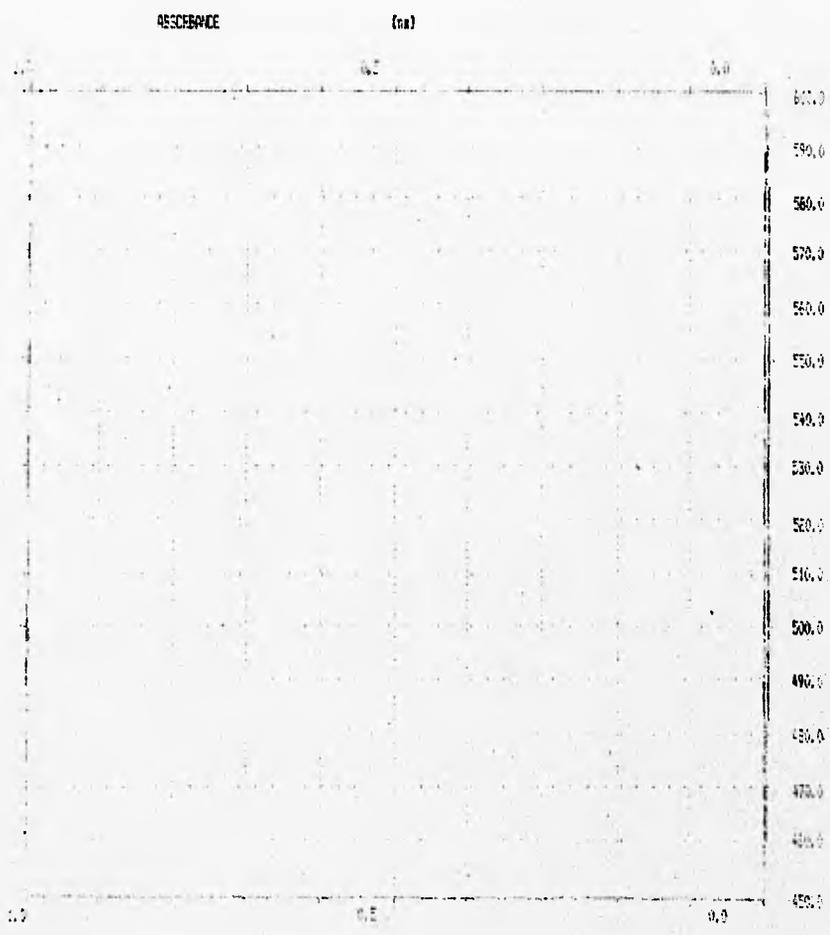
THRESHOLD : 0.100

BATCH: 001

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	00:55	529.1 nm (MAX)	0.241 ABS



Figura No. 3
PLACEBO SIN ACETATO DE PREDNISOLONA



THRESHOLD / 0.100

BATCH: 003

SAMPLE	CICLE	WAVELENGTH	DATA
01	01/01	No Peaks detected	

Analizando los datos de la tabla No. 1 y los espectros de absorción de las figuras 1, 2, y 3 se plantea lo siguiente:

- Se observa claramente en la figura No. 3 que el Placebo sin Acetato de Prednisolona presentó una respuesta despreciable; ésto nos indica que ni el vehículo de la suspensión, ni el Cloramfenicol que es el otro componente de la formulación, interfieren en la determinación del Acetato de Prednisolona para el método propuesto.
- La semejanza entre los espectros de absorción obtenidos para la Sustancia de Referencia y para la Muestra Problema (figs. No. 1 y 2), nos indica que la respuesta obtenida de esta última se debe únicamente al Acetato de Prednisolona, presentando valores de absorbancia cercanos a una λ aproximada a la reportada en la literatura.
- Se concluye que el método propuesto para la determinación del Acetato de Prednisolona en suspensión oftálmica es específico.

Linealidad del Sistema

En la tabla No. 2 se presentan los resultados obtenidos para la Linealidad del Sistema y en la gráfica No. 1 se observa la tendencia lineal de los datos.

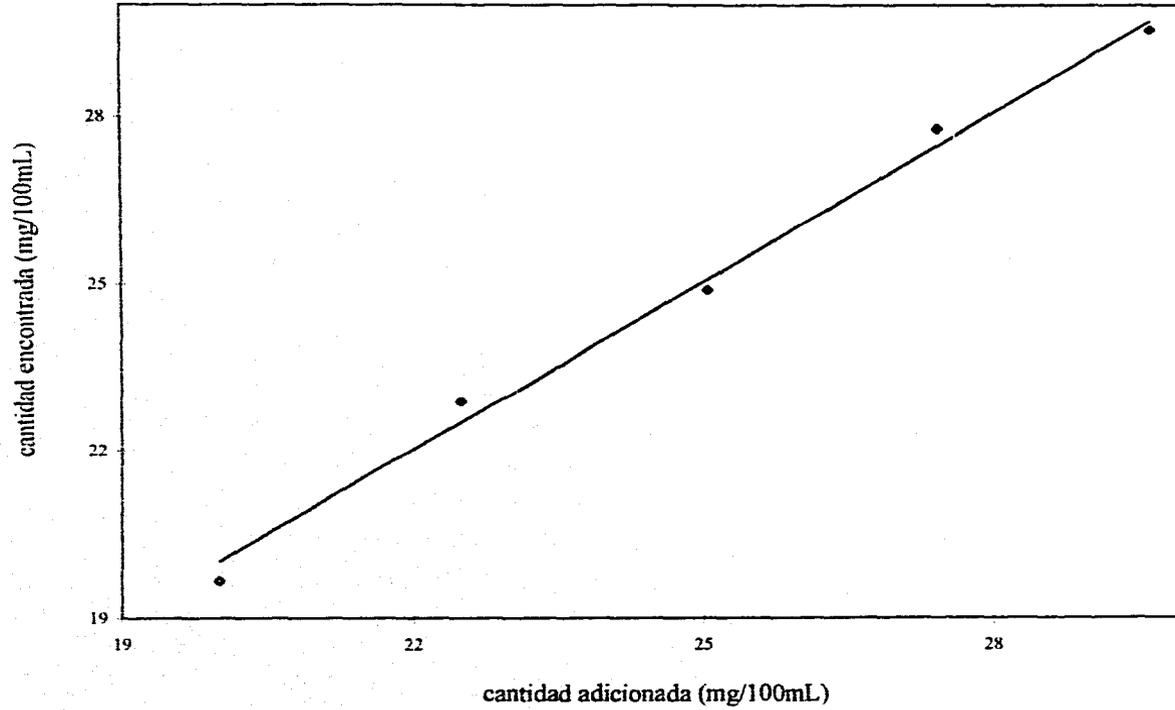
Tabla No. 2

Concentración %	Cantidad Adicionada mg/100 mL	Cantidad Encontrada mg/100 mL
80	20.0	19.60
	20.0	19.77
90	22.5	22.80
	22.5	23.02
100	25.05	24.99
	25.05	24.79
110	27.44	27.71
	27.44	27.83
120	29.64	29.68
	29.64	29.39

Concentración %	Promedio de la Cantidad Adicionada mg/100 mL	Promedio de la Cantidad Encontrada mg/100 mL	Regresión Lineal
80	20.0	19.68	$m = 1.0148$ $b = -0.3406$ $r = 0.9967$ $r^2 = 0.9934$
90	22.5	22.91	
100	25.05	24.89	
110	27.44	27.77	
120	29.64	29.53	

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Acetato de Prednisolona (Sustancia de Referencia)



GRAFICA No. 1

Los siguientes resultados corresponden a la prueba de "t de Student", aplicada tanto a la pendiente como a la ordenada al origen.

Pendiente	Ordenada al Origen
$t_{cal} = 0.3096$	$t_{cal} = -0.2832$
$t_{tab}(3,0.975) = 3.1825$	$t_{tab}(3,0.975) = 3.1825$
$I.C. = 1.0148 \pm 0.1521$	$I.C. = -0.3406 \pm 3.8269$
$L.S. = 1.1668$	$L.S. = 3.4863$
$L.I. = 0.8627$	$L.I. = -4.1675$

Analizando los resultados se puede observar que el sistema de medición es lineal, ya que b , m y r cumplen con los criterios de aceptación, tal como se muestra a continuación:

- Pendiente (m):

Como $|t_{cal}| < t_{tab}(3,0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la pendiente obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 1.

- Ordenada al Origen (b):

Como $|t_{cal}| < t_{tab}(3,0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la ordenada al origen, obtenido experimentalmente, no es significativamente diferente de 0.

- Coeficiente de Correlación (r):

Cumple con el criterio de aceptación , ya que éste debe ser $r \geq 0.99$ y el resultado obtenido fue $0.9967 > 0.99$.

- Coeficiente de Determinación (r^2):

El criterio de aceptación indica que éste deberá ser $r^2 \geq 0.98$ y el resultado obtenido fue $0.9934 > 0.98$. Por lo anterior, ya no es necesario realizar la “prueba de F” , pues ésta solo se realiza cuando el coeficiente de determinación obtenido es muy cercano al valor límite de 0.98 .

Repetibilidad del Sistema

La tabla No. 3 presenta los resultados obtenidos para evaluar este parámetro.

Tabla No. 3

Cantidad Adicionada mg/100 mL	Cantidad Encontrada mg/100 mL	% Encontrado
25.05	25.27	100.9
25.05	24.99	99.8
24.95	25.09	100.6
25.05	24.79	99.0
24.95	24.87	99.7
24.95	25.28	101.3

$$n = 6$$

$$\bar{X} = 100.2 \%$$

$$S_x = 0.861$$

$$C.V. = 0.8 \%$$

El sistema de medición es repetible, ya que el por ciento recuperado se encuentra dentro del intervalo para métodos espectrofotométricos que es del 97.0 - 103.0 % y el C.V. obtenido en forma experimental es menor del 1.5 %.

Linealidad del Método

La tabla No. 4 muestra las diferentes concentraciones de Acetato de Prednisolona en los placebos cargados, la cantidad adicionada, la cantidad encontrada y el porcentaje correspondiente. En la gráfica No. 2 se observa la tendencia lineal de estos datos.

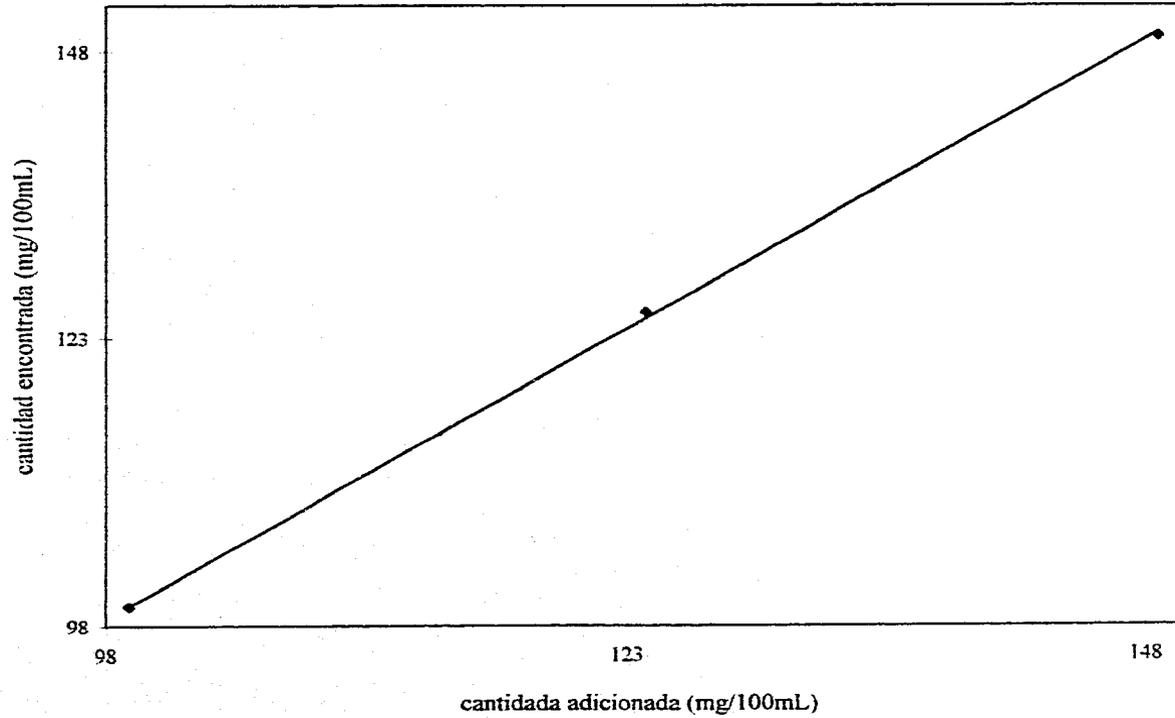
Tabla No. 4

Concentración %	Cantidad Adicionada mg/100 mL	Cantidad Encontrada mg/100 mL	% Encontrado
80	99.10	100.6	101.5
	99.10	99.7	100.6
	99.10	98.9	99.7
100	123.95	126.18	101.8
	123.95	125.68	102.2
	123.95	124.07	100.1
120	148.70	150.13	100.1
	148.70	149.4	100.5
	148.70	148.41	99.8

Concentración %	Promedio Cantidad Adicionada mg/100 mL	Promedio Cantidad Encontrada mg/100 mL	Regresión Lineal
80	99.10	99.7	$m = 1.0002$ $b = 0.8291$ $r = 0.9998$ $r^2 = 0.9996$
100	123.95	125.31	
120	148.70	149.31	

LINEALIDAD DEL METODO

Placebo cargado con Acetato de Prednisolona



GRAFICA No. 2

Los siguientes resultados corresponden a la prueba de “t de Student”, aplicada tanto a la pendiente como a la ordenada al origen.

Pendiente	Ordenada al Origen
$t_{cal} = 4.9745$	$t_{cal} = 0.0164$
$t_{tab}(1,0.975) = 12.7060$	$t_{tab}(1,0.975) = 12.7060$
I.C. = 1.0002 ± 0.5082	I.C. = 0.8291 ± 4.1181
L.S. = 1.5110	L.S. = 4.9472
L.I. = 0.4919	L.I. = -3.2890

El método propuesto es lineal, ya que, b , m , y r cumplen con los criterios de aceptación, como se muestra a continuación:

- Pendiente (m):

Como $|t_{cal}| < t_{tab}(1,0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la pendiente obtenida en forma experimental, no es significativamente diferente de 1.

- Ordenada al Origen (b):

Como $|t_{cal}| < t_{tab}(1,0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la ordenada al origen obtenido en forma experimental, no es significativamente diferente de 0.

- Coeficiente de Correlación (r):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que éste debe ser $r \geq 0.99$ y el resultado obtenido fue $0.9998 > 0.99$.

- Coeficiente de Determinación (r^2):

El criterio de aceptación indica que éste deberá ser $r^2 \geq 0.98$ y el resultado obtenido fue $0.9996 > 0.98$, por lo anterior, ya no es necesario realizar la “prueba de F” pues ésta solo se realiza cuando el coeficiente de determinación obtenido es muy cercano al valor límite de 0.98.

Repetibilidad y Exactitud al 100 %

En la tabla No. 5 se presentan los datos obtenidos, necesarios para evaluar este parámetro.

Tabla No. 5

Cantidad Adicionada mg/100 mL	Cantidad Encontrada mg/100 mL	% Recuperado
123.55	121.07	98.0
123.55	120.46	97.5
123.95	125.68	101.4
123.95	124.07	100.1
123.95	126.18	101.8
123.95	126.67	102.2

$$n = 6$$

$$\bar{X} = 100.1 \%$$

$$S = 2.0$$

$$C.V. = 2.0 \%$$

$$t_{cal} = 0.1220$$

$$t_{tab}(5,0.975) = 2.5706$$

Como el Coeficiente de Variación obtenido (2.0 %) es menor que el valor límite para métodos espectrofotométricos: 3.0 %, entonces el método de medición es repetible.

Intervalo de Confianza para el % recuperado:

- I.C. = 100.1 ± 2.097
- L.S. = 102.197
- L.I. = 98.003

Como $|t_{cal}| < t_{tab}(5,0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 100 %; entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la media obtenida en forma experimental, no es significativamente diferente del 100 %; por lo tanto, el método propuesto es exacto.

Reproducibilidad del Método.

En la tabla No. 6 se presentan los resultados obtenidos del método propuesto, realizado por dos analistas y en días diferentes.

Tabla No. 6

Día (j)	Analista (i) % de Recobro	
	1	2
1	100.1	101.7
	101.8	102.0
	102.2	101.7
2	100.2	101.3
	100.6	101.3
	100.2	101.0

$$\begin{aligned}n &= 12 \\ \bar{X} &= 101.1 \\ S_x &= 0.7460 \\ \text{C.V.} &= 0.7\%\end{aligned}$$

El Coeficiente de Variación obtenido es menor que 3.0 %, por lo tanto, el método propuesto es reproducible.

Tabla de Análisis de Varianza

Tabla No. 7

F.V.	G.L.	SC	MC	F _{cal}	F _{tab}
A(i)	1	173208.35	173208.35	-1.0000	161.4
Dj(i)	1	3.2866	3.2866	-0.0000189	161.4
E(ij)k	8	-125971.02	-155746.37		

Como:

a) Interacción entre analistas; $-1.0000 < 161.4$

b) Interacción entre días; $-0.0000189 < 161.4$

De los resultados obtenidos, por medio de la tabla de Análisis de Varianza, se concluye que el método propuesto es reproducible por diferentes analistas y en distintos días por un mismo analista.

Estabilidad de las soluciones obtenidas en el proceso de análisis

La tabla No. 8 presenta los resultados obtenidos durante la determinación de Acetato de Prednisolona, después de mantener las soluciones analíticas bajo las condiciones indicadas (antes de desarrollar color).

Tabla No. 8

Tiempo (h)	Condición		
	% Encontrado		
	<i>Luz Blanca</i>	<i>Oscuridad</i>	<i>Refrigeración</i>
0	101.0	99.7	100.1
3	99.7	100.1	100.1
24	96.4	99.3	99.3

Calculando el factor I obtenemos :

Tabla No. 8.1

Tiempo (h)	Condición		
	% Encontrado		
	<i>Luz Blanca</i>	<i>Oscuridad</i>	<i>Refrigeración</i>
3	98.7	100.4	100
24	95.4	99.6	99.2

Como se observa en la tabla No. 8.1, bajo las condiciones de Oscuridad y Refrigeración la muestra es estable durante 24 horas, pero bajo la condición de Luz Blanca, el valor del factor I, ya no se encuentra entre el intervalo de aceptación: 97.0 % - 103.0 %.

En la tabla No. 9 se presentan los resultados correspondientes a la estabilidad de las soluciones obtenidas, después de agregar los reactivos para desarrollar color.

Tabla No. 9

Tiempo (min)	Solución Colorida
	% Encontrado
30 (Tiempo propuesto)	101.0
	99.3
	99.7
60	102.1
	100.1
	100.1

Calculando el factor I obtenemos:

Tabla No. 9.1

Tiempo (min)	Solución Colorida
	% Encontrado
60	101.0
	100.8
	100.4

Como se observa en la tabla No. 9.1 las soluciones coloridas son estables 60 minutos después de adicionar el reactivo de Hidróxido de Tetrametilamonio, ya que el factor I se encuentra dentro del intervalo de aceptación : 97.0 % - 103.0 % .

VI. CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos al efectuar el procedimiento del método analítico propuesto para valorar Acetato de Prednisolona en la suspensión oftálmica estudiada, se plantean las conclusiones siguientes.

1.- El método propuesto para la valoración de Acetato de Prednisolona en la suspensión oftálmica estudiada, es *específico*, ya que la absorbancia presentada por el Cloramfenicol y el Vehículo (placebo sin cargar) fue despreciable, indicando así la ausencia de alguna posible interferencia en la respuesta de la solución problema.

Por otra parte los espectros de absorción de las soluciones obtenidas a partir de la Sustancia de Referencia y de la Suspensión oftálmica son semejantes, lo cual corrobora que la absorbancia obtenida de la muestra problema, corresponde únicamente al Acetato de Prednisolona.

2.- Respecto a la Linealidad se concluye que:

- El análisis de la gráfica No. 1, nos muestra la tendencia *lineal del sistema* al valorar Acetato de Prednisolona, Sustancia de Referencia, en un intervalo de concentraciones de 80 %, 90 %, 100 %, 110 % y 120 %.

- La gráfica No. 2, refleja la *linealidad del método* al valorar Acetato de Prednisolona, en la suspensión oftálmica estudiada, en un intervalo de concentraciones de 80 %, 100 % y 120 %.

- Tanto para el sistema como para el método el planteamiento de aceptación se puede comprobar al analizar las pruebas de t , donde los valores obtenidos de la ordenada al origen y de la pendiente no son significativamente diferentes de 0 y de 1 respectivamente. Además el coeficiente de correlación obtenido en ambos casos es mayor de 0.99; por lo que podemos concluir que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

3.- El método propuesto es *exacto*, ya que, el coeficiente de variación obtenido (C.V.) es menor de 3.0 % y el resultado de la prueba de t aplicada, demuestran que el valor de la media experimental no es significativamente diferente del 100 % de la cantidad de Acetato de Prednisolona expresada en el marbete del producto estudiado.

4.- El método propuesto es *repetible*, ya que, en las pruebas efectuadas con la Sustancia de Referencia, el coeficiente de variación obtenido (C.V.), fue menor de 1.5 % (para el sistema) y en las determinaciones realizadas a la suspensión oftálmica el coeficiente de variación fue menor del 3.0 % (para el método).

5.- El método propuesto es *reproducibile*, ya que, al realizar las pruebas de valoración de Acetato de Prednisolona, en la suspensión oftálmica estudiada, bajo diferentes factores de variación, los resultados cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación especificados para el coeficiente de variación (C. V.), siendo éste menor de 3.0 %. Respecto al

análisis de varianza efectuado, no se presenta efecto alguno debido al factor analista ni al factor día.

6.- Las solución clorofórmica que contiene al Acetato de Prednisolona, es *estable*, durante 24 horas, sólo bajo las condiciones de Oscuridad y Refrigeración, ya que expuesta a la Luz Blanca, el porcentaje de recuperación disminuye y queda fuera del intervalo de aceptación, por lo que es necesario que el procedimiento analítico se concluya en un lapso menor a las 24 horas, manteniendo las soluciones en la oscuridad o en refrigeración.

Por otra parte, la estabilidad de las soluciones coloridas no se ve afectada al cabo de 60 minutos de haber agregado la solución de Hidróxido de Tetrametilamonio, por lo que se concluye que el tiempo de lectura se puede prolongar hasta 30 minutos más que el tiempo propuesto, sin encontrar variaciones considerables.

Conclusión Final:

Los resultados obtenidos muestran que los parámetros evaluados en el método propuesto, cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación establecidos en la validación de métodos analíticos. Así pues, se demuestra que las modificaciones realizadas al método oficial son adecuadas, pues a pesar de variar condiciones de disolvente, temperatura y tiempo de reacción, los resultados son confiables para la cuantificación de Acetato de Prednisolona, en la suspensión oftálmica estudiada.

ANEXO I

LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL METODO.

Ecuaciones matemáticas para determinar la linealidad del sistema y del método:

- (1) Calcular la pendiente (m) de la línea de regresión.

$$m = \frac{N t (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{N t (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

- (2) Calcular el intercepto (b) de la línea de regresión.

$$b = \frac{\sum y - m (\sum x)}{N t}$$

Para saber si los valores obtenidos experimentalmente son estadísticamente diferentes a los considerados como teóricos, se aplican pruebas de t y se establecen límites de confianza para m y para b.

- a) Prueba de "t de Student" para la pendiente:

$$H_0: m = \alpha$$

$$H_1: m \neq \alpha \quad \alpha = 1$$

$$t_{cal} = \frac{[(m - \alpha)] [S_x] [(n - 1)^{1/2}]}{S_{y/x}}$$

b) Prueba "t de Student" para la ordenada al origen:

$$H_0 : b = \beta$$

$$H_1 : b \neq \beta \quad \beta = 0$$

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{S_{y/x} \left[\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}}$$

Desviación Estándar en la dirección y ($S_{y/x}$)

$$S_{y/x} = \left[\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

c) Intervalos de confianza:

* Desviación Estándar para la ordenada al origen (S_b):

$$S_b = S_{y/x} \left[\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

c.1) Límites de confianza para la ordenada al origen:

$$LC_b = b \pm [t_{tab}(n-2, 0.975)] [S_b]$$

* Desviación Estandar para la pendiente (Sm):

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{[\sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2}}$$

c.2) Límites de confianza para la pendiente:

$$LC_m = m \pm [t_{tab}(n-2, 0.975)] [S_m]$$

donde :

- m = valor experimental de la pendiente
- α = valor teórico de la pendiente = 1
- b = valor experimental de la ordenada al origen
- β = valor teórico de la ordenada al origen = 0
- x_i = cantidad adicionada del fármaco
- y_i = cantidad encontrada del fármaco
- \bar{x} = media de las cantidades adicionadas
- S_x = desviación estándar de las cantidades adicionadas
- N = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución
- t = número de diluciones
- n = número de determinaciones
- \hat{y}_i = Los valores de \hat{y}_i son los puntos sobre la línea de regresión calculada y corresponden a los valores individuales de x_i . Los valores de \hat{y}_i para un valor dado de x_i , son fácilmente calculados de la ecuación de regresión.

(3) Cálculo del coeficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = \frac{[N t(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[N t(\sum x^2) - (\sum x)^2][N t(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

(4) Cálculo de coeficiente de correlación (r).

$$r = (r^2)^{1/2}$$

Los datos de la curva de calibración se sujetan a un análisis de varianza en donde los parámetros de evaluación son las F resultantes de la distribución y tratamiento de datos. Por lo tanto se tienen F de regresión y F de falta de ajuste a la relación lineal simple.

(5) Contrucción de la Tabla de Análisis de Varianza

a) SC_r = Suma de cuadrados de regresión.

$$SC_r = (m)(\sum xy) + (b)(\sum y) - (\sum y)^2 / n$$

b) SC_{er} = Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SC_{er} = \sum y^2 - (m)(\sum xy) - (b)(\sum y)$$

c) SC_{ep} = Suma de cuadrados del error puro.

$$SC_{ep} = \sum y^2 - (\sum y^2) / r$$

d) SC_{fa} = Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$$SC_{fa} = SC_{er} - SC_{ep}$$

TABLA I

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>F exp</i>
Regresión	1	SCr	SCr	$Fr = \frac{MCr}{MCer}$
Error de Regresión	n-2	SCer	$\frac{SCer}{g.l.e.r.}$	
Falta de Ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCfa	$\frac{SCep}{g.l.f.a.}$	$Ffa = \frac{MCfa}{MCep}$
Error Puro	t (r-1)	SCep	$\frac{SCep}{g.l.e.p.}$	

t = Número de concentraciones

r = Número de replicaciones por concentración

n = r t = Número de pares ordenados

REPETIBILIDAD

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la repetibilidad.

- 1) Determinar la media (\bar{y}) de los resultados.

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

2) Determinar la Desviación Estándar de los resultados.

$$S = \left[\frac{N (\sum y^2) - (\sum y)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

3) Determinar el Coeficiente de Variación.

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

EXACTITUD AL 100 %

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la exactitud del método.

1) Calcular el porcentaje de recobro (R) en cada una de las muestras.

2) Calcular la media aritmética del porcentaje de recobro.

$$\bar{R} = \frac{\sum R_i}{N}$$

3) Calcular la desviación estándar del porcentaje de recobro.

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

4) Calcular el coeficiente de variación.

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

5) Prueba de "t de Student" para la media.

$$H_0 : R = \mu$$

donde : $\mu = 100 \%$

$$H_1 : R \neq \mu$$

$$t_{cal} = \frac{R - \mu}{\sigma y}$$

donde : $\sigma y = S / (N)^{1/2}$

* Intervalo de confianza del porcentaje encontrado (I.C.)

$$I.C. = R \pm t_{(n-1, 0.975)} [\sigma y]$$

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

Los resultados obtenidos se tabulan de acuerdo con la tabla II, para evaluar la reproducibilidad mediante el análisis de varianza representado en la tabla III. Este análisis permite conocer las interacciones entre analistas, días.

TABLA II

		ANALISTA (i)	
		% ENCONTRADO	
		1	2
D í a	1	Y ₁₁₁	Y ₂₁₁
		Y ₁₁₂	Y ₂₁₂
		Y ₁₁₃	Y ₂₁₃
(j)	2	Y ₁₂₁	Y ₂₂₁
		Y ₁₂₂	Y ₂₂₂
		Y ₁₂₃	Y ₂₂₃

Donde "y" es el resultado de cada analista (primer subíndice) en cada día (segundo subíndice) para cada repetición (tercer subíndice).

Calcular las siguientes sumatorias:

- 1) $\sum y_{ijk} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + \dots + Y_{223})$
- 2) $\sum Y_i^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$
- 3) $\sum Y_j^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$
- 4) $\sum Y_{ii}^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$
- 5) $S y_{ijk}^2 = [(Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{223})^2]$

Proceder conforme la siguiente tabla de análisis de varianza.

Fuente de variación (FV)	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados (S C)	Media de cuadrados (MC)	F calculada	F tab (0.05, GLn um/GLden)
Analista (A) Ai	(i - 1)	$\frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{(\sum Y_{ijk})^2}{ijk}$	$\frac{SCA}{(i - 1)}$	$\frac{MCA}{MCAD}$	0.05, $\frac{(i - 1)}{(j - 1)}$
Día (D) Dj	(j - 1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum Y_i^2}{jk}$	$\frac{SCD}{(j - 1)}$	$\frac{MCD}{MCAD}$	0.05, $\frac{(j - 1)}{(i - 1)(j - 1)}$
Error Experiment al (E) Eijk	ij (k - 1)	$\frac{\sum Y_{ijk}^2 - \sum Y_{ij}^2}{k}$	$\frac{SCE}{ij (k - 1)}$		

Donde: i = número de analistas; j = número de días; k = número de repeticiones

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

Los resultados obtenidos se tabulan con base en el formato de la tabla IV, para calcular el coeficiente de variación.

TABLA IV

Tiempo (h)	Condición % Encontrado		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
0	Y _A	Y _D	Y _G
	Y _B	Y _E	Y _H
	Y _C	Y _F	Y _I
3	Y ₁	Y ₁₀	Y ₁₉
	Y ₂	Y ₁₁	Y ₂₀
	Y ₃	Y ₁₂	Y ₂₁
6	Y ₄	Y ₁₃	Y ₂₂
	Y ₅	Y ₁₄	Y ₂₃
	Y ₆	Y ₁₅	Y ₂₄
24	Y ₇	Y ₁₆	Y ₂₅
	Y ₈	Y ₁₇	Y ₂₆
	Y ₉	Y ₁₈	Y ₂₇

Calculo del coeficiente de variación :

Para cada condición/tiempo/muestra, calcular el factor (I) con la siguiente formula :

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

$$I_1 = \frac{Y_1}{Y_A} \times 100$$

$$I_{10} = \frac{Y_{10}}{Y_D} \times 100$$

$$I_{19} = \frac{Y_{19}}{Y_G} \times 100$$

$$I_2 = \frac{Y_2}{Y_B} \times 100$$

$$I_{11} = \frac{Y_{11}}{Y_E} \times 100$$

$$I_{20} = \frac{Y_{20}}{Y_H} \times 100$$

$$I_3 = \frac{Y_3}{Y_C} \times 100$$

$$I_{12} = \frac{Y_{12}}{Y_F} \times 100$$

$$I_{21} = \frac{Y_{21}}{Y_I} \times 100$$

•
•
•

•
•
•

•
•
•

$$I_9 = \frac{Y_9}{Y_C} \times 100$$

$$I_{18} = \frac{Y_{18}}{Y_F} \times 100$$

$$I_{27} = \frac{Y_{27}}{Y_I} \times 100$$

Para cada condición/ tiempo calcular la media del factor (I) con la siguiente formula :

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

donde: N = Número de muestras para cada condición / tiempo.

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_6 = \frac{I_{16} + I_{17} + I_{18}}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_7 = \frac{I_{19} + I_{20} + I_{21}}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

$$I_8 = \frac{I_{22} + I_{23} + I_{24}}{3}$$

$$I_4 = \frac{I_{10} + I_{11} + I_{12}}{3}$$

$$I_9 = \frac{I_{25} + I_{26} + I_{27}}{3}$$

$$I_5 = \frac{I_{13} + I_{14} + I_{15}}{3}$$

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. American Medical Association. *Medicamentos Nuevos* Edit. La Prensa Médica Mexicana. México (1975). pp 368-376
2. Serrano Barajas Alma . *Validación de un método analítico para cuantificar Acetato de Parametasona en tabletas y suspensión, por Cromatografía de líquidos de alta presión.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M. México, (1995).
3. Goodman & Gilman A. y cols. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* 8a edición. Edit. Médica Panamericana. México (1991). pp 1390-1410
4. Goth, Andres *Farmacología Clínica.* 12a edición. Edit. Medica Panamericana. Montevideo R. O. de Uruguay (1990) pp. 433-442 .
5. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.* Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6a edición. México (1994). pp 153, 713
6. Clarke E.G.C. y cols. *Isolation and Identification of Drugs.* 2a edition. Edit. The Pharmaceutical Press. London (1986). pp 508-509
7. *The Pharmacopoeia of the United States of America XXII.* United States Pharmacopoeial Convention. Inc. U.S.A. (1994). pp 1130-1131

8. *Remington's Pharmaceutical Sciences* . 18th edition. Mack Publishing Company. U.S.A. (1990) . pp 909
9. Martindale. *The Extra Pharmacopoeia*. 30 edition. Edit. The Pharmaceutical Press. London (1989) . pp 898-900 , 872-881.
10. Oteiza, R.M.; Wooten, R.S.; Kenner, C.T.; Graham, R.E.; Biehl, E.R. *Kinetics and mechanism of blue tetrazolium reaction with corticosteroids*. J. Pharm. Sci. , 1977, 66(10) 1385-1387.
11. Graham, R.E.; Biehl, E.R.; Kenner, C.T. *Rapid blue tetrazolium procedure for analysis of corticosteroids in pharmaceutical preparations*. J. Pharm. Sci. 1987, 67(6), 792-795 .
12. Kleeman, W.P.; Bailey, L.C. *Simplex optimization of the blue tetrazolium assay procedure for α -ketol steroids*. J. Pharm. Sci., 1985, 74(6), 655-9 .
13. Graham, R.E.; Kenner, C.T. *Absorbance-pH relationship in the steroid tetrazolium reaction*. J. Pharm. Sci., 1973, 62(1) 103-107 .
14. Guía profesional de Medicamentos . *Manual de Consulta para Médicos, Odontólogos y Farmacéuticos*. 3a Edición . Edit. El Manual Moderno S.A. de C. V. México, D.F. (1989) . pp 364-365.
15. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. 38 Edición. Ediciones P.I.M. México (1992). pp 332-333.

16. *Drug Information*. American Hospital Formulary Service. American society of Hospital Pharmacist. U.S.A. (1992) pp 1645 , 1833
17. Higuchi, T. and Bodin, J.I. *Pharmaceutical Analysis*. Edit. John Wiley & Sons. U.S.A. (1961) . pp 72-73
18. *Seminario de Validación en la Industria Farmacéutica*. Asociación Farmacéutica Mexicana. Mayo, (1994). Facultad de Química. U.N.A.M. .
19. Frías, J. Alejandro . *Desarrollo y Validación de un Método Analítico para determinar Cafeína en un jarabe que también contiene Acetaminofen, Maleato de Clorfeniramina y Clorhidrato de Fenilpropanolamina*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M. México, (1995).
20. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. *Requisitos mínimos para la Validación de un Método Analítico*. Colegio Nacional de Q.F.B. Secretaría de Salud. México, (1991).
21. Hokanson, C. *A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development. Part I. The initial method validation process*. *Pharmaceutical Technology*. 18 (9), 118-130, 1994.
22. Cassarigne, R. H., Munguía B. y cols. *Material del curso Control y Aseguramiento de la Calidad Analítica en el Laboratorio*. (1994).
23. Walpole, Rohald E. *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*. Edit. Mc. Graw-Hill. Edición 2. México, (1989).

24. Willard, Hobart H. *Métodos Instrumentales de Análisis*. 1a Edición. Edit. Compañía Editorial Continental. México (1992). pp. 451, 207, 715-743 .

25. Skoog, Douglas A. *Análisis Instrumental*. 1a. Edición. Edit. Nueva Editorial Interamericana. México (1983) . pp. 68-88, 133, 558-584.