

61.241



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química



EXAMENES DE GRADUACIONES
FAC. DE QUIMICA

**METODO POR CLAR PARA VALORAR
FUROSEMIDA Y SU PRODUCTO DE
DEGRADACION EN INYECTA-
BLES Y TABLETAS.**

T E S I S

Que presenta:

Jorge Gutiérrez Frago

para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



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

	PAG.
I. INTRODUCCION.....	1
II. GENERALIDADES.....	2
2.1 Monografía de la Furosemida.....	2
2.2 Propiedades Físicoquímicas.....	3
2.3 Estabilidad.....	7
2.4 Farmacología.....	9
2.5 Farmacocinética.....	9
2.6 Toxicidad.....	10
2.7 Dosis.....	10
2.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	10
2.9 Validación de métodos analíticos.....	21
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
IV. RESULTADOS.....	42
4.1 Linealidad.....	42
4.2 Repetibilidad.....	42
4.3 Exactitud.....	42
4.4 Precisión.....	42
4.5 Especificidad.....	42
4.6 Sensibilidad.....	43
4.7 Reproducibilidad.....	43
4.8 Estabilidad de la muestra.....	43
4.9 Comparación de métodos.....	43
V. DISCUSION DE RESULTADOS.....	62
VI. CONCLUSIONES.....	67
VII. BIBLIOGRAFIA.....	68

INDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla No. I Gufa general para la selecci3n de adsorbente en "CLAR".....	14
Tabla No. II Rellenos de columna y fases m3viles comunmente utilizadas.....	15
Tabla No. III Proceso de c3lculo para reproducibilidad del m3todo analftico.....	29
Tabla No. IV An3lisis de varianza para determinar reproducibilidad.....	30
Tabla No. V y VI Repetibilidad del m3todo para inyectables.....	47
Tabla No. VII y VIII Repetibilidad del m3todo para tabletas.....	49
Tabla No. IX, X y XI Exactitud del m3todo para inyectables.....	50
Tabla No. XII, XIII y XIV Exactitud del m3todo para tabletas.....	51
Tabla No. XV Precisi3n del sistema.....	54
Tabla No. XVI Precisi3n del m3todo para inyectables.....	54
Tabla No. XVII Precisi3n del m3todo para tabletas.....	55
Tabla No. XVIII Sensibilidad.....	59

	PAG.
Tabla No. XIX	
Reproducibilidad del método.....	59
Tabla No. XX	
Estabilidad de la muestra en inyectables.....	60
Tabla No. XXI	
Estabilidad de la muestra en tabletas.....	60
Tabla No. XXII	
Comparación de métodos para inyectables.....	61
Tabla No. XXIII	
Comparación de métodos para tabletas.....	61
Tabla No. XXIV	
Análisis de varianza (ANADEVA).....	65

INDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura No. 1 Espectro UV de la Furosemida.....	4
Figura No. 2 Espectro UV del ácido-4-cloro-5-Sulfamoilantranílico.....	5
Figura No. 3 Espectro IR de la Furosemida.....	6
Figura No. 4 Vías de degradación fotoquímica de Furosemida en metanol.	7
Figura No. 5 Productos de degradación de Furosemida en medio ácido....	8
Figura No. 6 Linealidad del estándar de Furosemida.....	44
Figura No. 7 Linealidad de Furosemida en placebo para inyectables.....	45
Figura No. 8 Linealidad de Furosemida en placebo para tabletas.....	46
Figura No. 9 Relación del efecto-placebo en inyectables y tabletas....	53
Figura No. 10 Cromatogramas del placebo para inyectables y tabletas....	56
Figura No. 11 Cromatogramas de Furosemida en medio ácido y básico.....	57
Figura No. 12 Cromatogramas del estándar interno (Tolbutamida) ácido-4-cloro-5-sulfamoilantranílico y Furosemida.....	58

INDICE DE DIAGRAMAS

	PAG.
Diagrama No. 1 Determinación de Furosemida estándar por CLAR.....	36
Diagrama No. 2 Determinación de Furosemida en inyectables por CLAR....	37
Diagrama No. 3 Determinación de Furosemida en tabletas por CLAR.....	38

I. INTRODUCCION

La Furosemida es un diurético potente utilizado en el tratamiento del edema cardíaco y pulmonar así como en casos de hipertensión.

Este fármaco es efectivo en casos de disfunción renal produciendo diuresis a dosis altas, cuando los demás fármacos son inefectivos.¹

Este medicamento se encuentra incluido dentro del cuadro básico de medicamentos del Sector Salud y es ampliamente utilizado en nuestro país.

Para la cuantificación de la Furosemida, los métodos oficiales propuestos por la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos (FNEUM)⁷ y la United States Farmacopeia (USP XXI)⁸, se basan en el análisis espectrofotométrico en la región ultravioleta (UV).

En la práctica diaria, estos métodos son poco reproducibles y presentan la desventaja de no ser específicos, por lo que no pueden utilizarse en estudios de estabilidad acelerada.

Con base en lo anterior, se llevó a cabo el presente trabajo, cuyo objetivo es desarrollar y validar un método alternativo para valorar cualitativa y cuantitativamente la Furosemida y su producto de degradación: el ácido 4-cloro-5-sulfamiloantranílico (ACS), en inyectables y tabletas utilizando para ello, un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

II. GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFIA DE LA FUROSEMIDA

NOMBRES QUIMICOS: Acido 4-cloro-N-(2-furfurilmetilo)-5-sulfamoil-antranílico¹⁹

Acido 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranílico²⁴

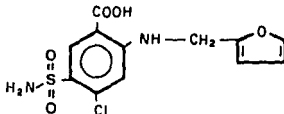
Acido 4-cloro-2-(2-N-furilmetilamino)-5-sulfamoil-benzoico⁹

Acido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-[(2-furanilmetilo)amino]-benzoico⁸

NOMBRE GENERICO: Furosemida

FORMULA CONDENSADA: $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$

FORMULA DESARROLLADA:



PESO MOLECULAR: 330.74

NOMBRES COMERCIALES: Furosemid, Furosemida, Fursemida¹⁹, Salud 058, Lasix^R, Drypta^{1R} y Frósid^R 10

2.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

DESCRIPCION:	Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo, insípido e inodoro, inestable a la luz y estable al aire ¹⁸
PUNTO DE FUSION:	203 - 205°C, con descomposición ²⁰
pKa:	3.9 ²⁰
SOLUBILIDAD:	Soluble en acetona, metanol, dimetilformamida, y en soluciones alcalinas, en 75 partes de etanol al 96%; en 850 partes de éter, ligeramente soluble en agua y cloroformo. ¹⁹

ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA

En una solución de metanol-acetato de sodio 0.005 M a pH 2.5, la Furose-mida presenta una absorbancia máxima a 275.5 nm. El ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico bajo las mismas condiciones presenta máximos a 200.5 y 227.0 nm (Figuras No. 1 y No. 2).

ESPECTRO DE ABSORCION INFRARROJA

En la figura No. 3 se presenta el espectro infrarrojo de la Furose-mida.

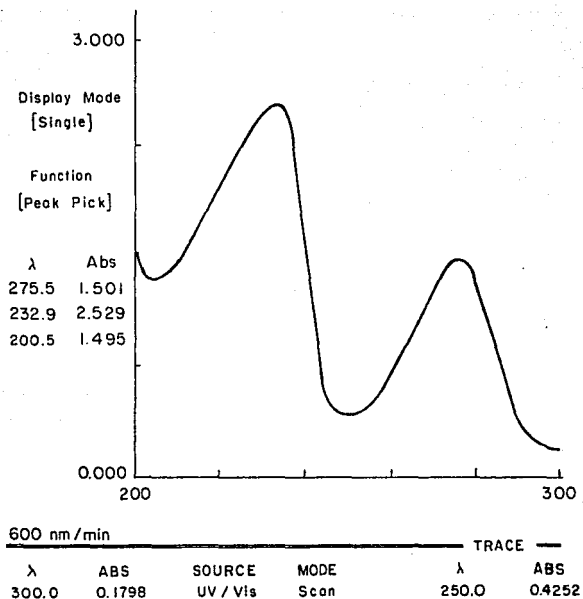


Fig. No. 1 Espectro de absorción al ultravioleta de furosemida en metanol:acetato de sodio 0.005M pH 2.5

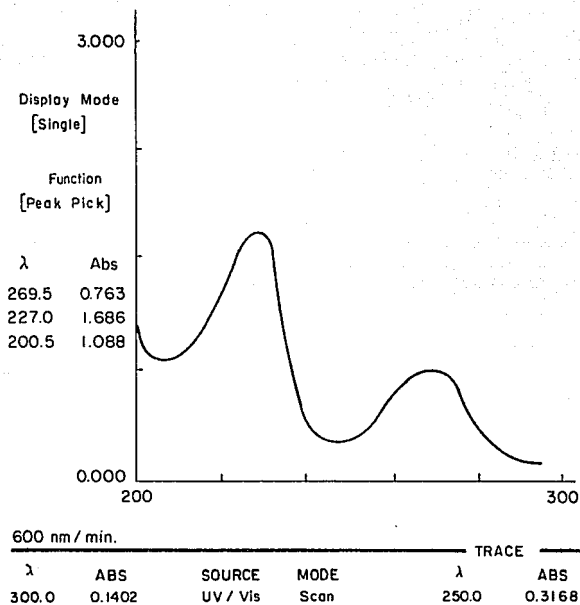


Fig. No. 2 Espectro de absorción al ultravioleta del ácido-4-cloro-5-sulfamoiiantranílico (ACS) en metanol;acetato de sodio 0.005M pH 2.5

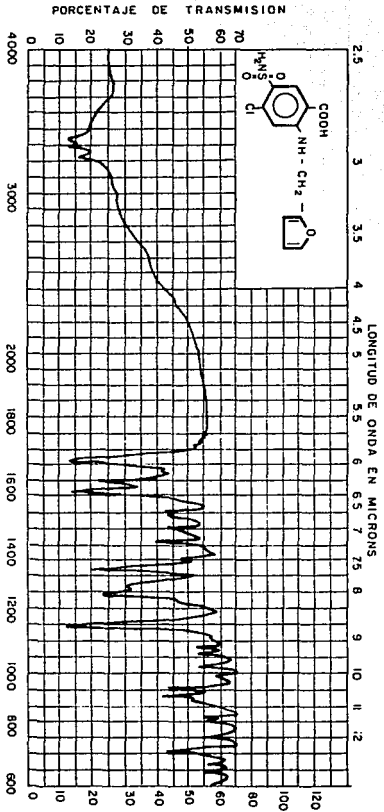


FIG. No. 3 Espectro de absorción en la región del infrarrojo (IR) de Furosemido sustancia de referencia, en pastillos de KBr.

2.3 ESTABILIDAD

Moore¹⁴ et al. realizaron un estudio de estabilidad, en el cual se irradió una solución de Furosemda (5×10^{-4} M) en metanol con luz ultravioleta a 365 nm, los productos se cuantificaron utilizando tanto cromatografía de gases como de líquidos. Los autores encontraron que los principales productos de degradación fueron el ácido N-furfuril-5-sulfamoi-antranílico y el ácido 4-cloro-5-sulfamoi-antranílico proveniente de la degradación fotoquímica

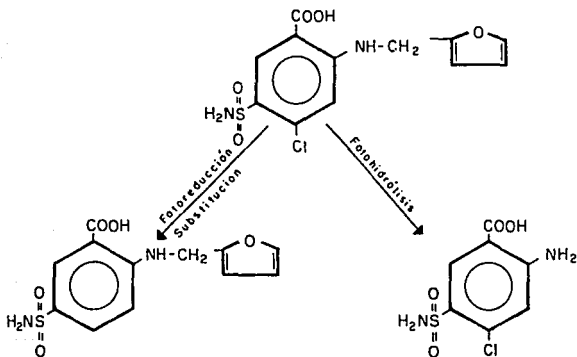


Fig. No. 4. Vías de degradación fotoquímica de Furosemda en metanol.

A. G. Ghanekar¹⁶ llevó a cabo un estudio de estabilidad de Furosemida en medio ácido y alcalino, llegando a la conclusión que es más estable en medio alcalino que en medio ácido y que el pH de las soluciones de Furosemida influyen directamente en su estabilidad.

En la fig. No. 5 se presentan los principales productos de degradación de la Furosemida en medio ácido.

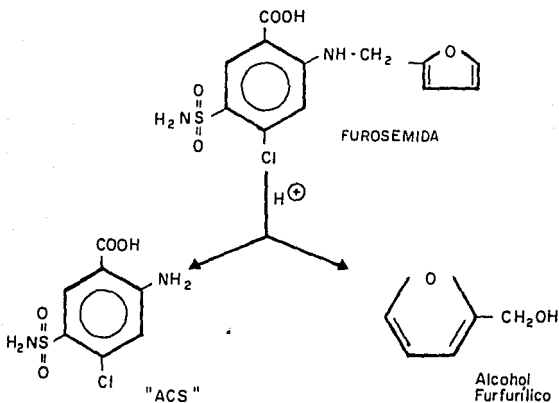


Fig. No. 5 Productos de degradación de Furosemida en medio ácido

2.4 FARMACOLOGIA

La Furosemda es un inhibidor de la anhidrasa carbónica; in vitro presenta la misma potencia que la sulfonamida pero es mucho más efectiva que las tiazidas para estimular la excreción de sodio y agua. En túbulos perfundidos y aislados inhibe el transporte de cloro en la rama ascendente gruesa del asa de Henle, cuando se agrega este ión al líquido de perfusión. En los estudios de micropunción se observa una inhibición parcial de la reabsorción de sodio en los túbulos proximales.^{21,22}

2.5 FARMACOCINETICA

Los estudios de farmacocinética clínica²⁰ llevados a cabo después de la administración de una dosis intravenosa única de 0.5, 1.0, ó 1.5 mg/kg de peso, indican que la diuresis máxima ocurre entre los 20 y 60 min. después de la inyección. El volumen aparente de distribución es en promedio un 11.4% del peso corporal y es independiente de la dosis.

En estos estudios la vida media plasmática promedio fue de 29.5 minutos, con una depuración de 162 ml/min. Se encontró que la excreción renal es la principal vía de eliminación, y en promedio alcanza un 80% de la dosis administrada con una depuración renal media de 149 ml/min.

Dado a que este valor excede el índice de filtración glomerular, se piensa que debe existir secreción tubular de la Furosemda, ya que el fármaco está unido a las proteínas plasmáticas.

Así mismo, se ha observado que la biodisponibilidad se ve afectada por la formulación por lo que se ha documentado que algunas marcas comerciales pueden tener baja biodisponibilidad.¹⁵

2.6 TOXICIDAD

La toxicidad clínica frecuentemente se produce por desequilibrio de líquidos y electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{++}). Otras reacciones que se presentan son trastornos gastrointestinales y a dosis altas, perturbaciones auditivas. Se han reportado leucopenia y trombocitopenia después de un tratamiento con Furosemida, las cuales son reversibles.²⁰ En algunas ocasiones puede provocar diarrea.⁹ Está contraindicada en mujeres con posibilidad de embarazo.

2.7 DOSIS

Las dosis usuales van de 40-80 mg/día por vía oral; dosis mayores a 500 mg. se administran sólo bajo estricta vigilancia médica.²⁰

2.8 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC), es uno de los métodos analíticos más ampliamente utilizados en la actualidad. En un principio HPLC significaba: Cromatografía de líquidos de alta presión, hoy es más comúnmente utilizado el término Cromatografía líquida de alta eficiencia o de alta resolución, debido a que la alta presión a la que se trabaja no es el único factor que determina las características de este método.

Dado el rápido desarrollo en los años pasados este método representa actualmente un procedimiento estándar eficaz y rápido.²³

La calidad de empaques de las columnas preparadas y las condiciones instrumentales permiten:

- a) Selectividad óptima
- b) Tiempos de análisis cortos
- c) Gran sensibilidad
- d) Mayor reproducibilidad
- e) Detección cuantitativa
- f) Precisión mayor de $\pm 0.5\%$

Para lograr resultados óptimos en los sistemas cromatográficos es de mucha importancia elegir la forma correcta para el desarrollo del análisis.

En la tabla número I se muestra un esquema de como se pueden lograr resultados óptimos para el análisis a desarrollar.²⁶

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), se caracteriza por utilizar columnas de diámetro pequeño (2.2-4.6 mm) y longitud de 10 - 25 cm. la introducción de la muestra es precisa, sin necesidad de usar volúmenes grandes. Los detectores continuos especiales, son capaces de operar a caudales muy bajos y detectar cantidades muy pequeñas. Lo anterior permite lograr:

1. Análisis rápidos
2. Alta resolución
3. Instrumentación automatizada

INSTRUMENTACION

La instrumentación requerida para la cromatografía de líquidos de alta resolución es relativamente simple; a continuación se presenta una lista de sus componentes:

1. Reservorio (depósito de la fase móvil)
2. Bomba de presión

3. Sistema de inyección de la muestra
4. Columna
5. Detector
6. Registrador y procesador de datos

COLUMNAS

Son parte importante del método, ya que en ellas se lleva a cabo la separación y resolución de los componentes de la muestra.

La fase estacionaria debe ser térmicamente estable y químicamente inerte con la fase móvil y con los solutos. La velocidad de la separación depende en gran parte del empaque de la columna.

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

- a) Grandes superficies de contacto
- b) Una capa fina de adsorbente uniformemente distribuida
- c) Superficies con estructuras abiertas de fácil acceso para la fase móvil
- d) Estabilidad
- e) Dificultad para ser comprimidos por presiones altas

Los materiales de relleno de columna pueden ser básicamente de dos tipos:

1. Gel de Sílice:

Gel de Sílice modificados químicamente en la superficie, con grupos orgánicos diferentes y por lo tanto con comportamientos de selectividad o especificidad; las gels de sílice modificadas químicamente en la superficie, se encuentran unidas a grupos funciona-

les como octadecilsilano (C_{18}), fenilamino, ciano, etcétera.

2. Oxido de Aluminio:

Existen diferentes tipos de adsorbentes porosos o superficialmente porosos, el tamaño de la partícula puede variar de 5 a 15 micras, lo cual es importante, ya que de ello depende el área de contacto.

Existen empaques especiales para el análisis de carbohidratos, triglicéridos y ácidos grasos.

Para cromatografía de intercambio iónico, existen columnas con fases unidas que permiten el intercambio de aniones, cationes y aniones débiles, las columnas pueden tener diferentes longitudes y diámetros dependiendo de la aplicación que se les dé.²³ En la tabla II se muestran algunos rellenos de columnas y sus aplicaciones.

La cromatografía líquida de reparto define dos o más tipos de procesos cromatográficos según sea la polaridad de la fase estacionaria.

- a) Cromatografía de fase normal
- b) Cromatografía de fase inversa o reversa

CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (ej. Sílice), y la fase móvil es apolar (ej. Heptano, tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

Tabla No. 1

Guía para la Selección de adsorbente en "CLAR"

PROPIEDADES DE LA MUESTRA	TIPO DE CROMATOGRAFIA	EMPAQUE	FASE MOVIL		
<p>MUESTRA</p> <p>soluble en disolventes orgánicos</p>	diferencia en p.m. 10 %	CEM	Malla de poliestireno	Disolventes orgánicos de baja viscosidad (THF, Tolueno)	
	Otras Diferencias	Fuertemente polar (soluble en MeOH, CHCl ₃)	Fase normal	Grupos CN o NH ₂ unidos a la Sílice C ₁₈	CH ₃ CN, H ₂ O, CHCl ₃ Heptano.
		No polar (soluble en heptano CHCl ₃)	Fase reversa		
	<p>PM < 2000</p> <p>Soluble en agua</p>	Electrolitos	INTERCAMBIO IONICO Intercambio catiónico	Resina de intercambio iónico	Buffers 0.01M pH 3.0-7.5 Fuerza muy Iónica y pH para alcanzar la separación.
Diferencias aniónicas		Intercambio aniónico	Resina de intercambio iónico		
Azúcares, polioles		FASE ESPECIALMENTE UNIDA.	Sílica	Comenzar con agua. Adicionar CH ₃ CN o MeOH para producir resolución.	
<p>PM > 2000</p> <p>Soluble en agua</p>	No Electrolitos			Agua	
	Soluble en disolventes orgánicos	CEM	Sílica	Solventes orgánicos de baja viscosidad. (THF, Tolueno)	
		CEM acuosa	Sílica	Agua	

TABLA No. 11
RELLENOS DE COLUMNA (FASES ESTACIONARIAS) Y FASES MOVILES
COMUNMENTE UTILIZADOS

TIPO	FASE ESTACIONARIA	FUNCIONALIZACION	FASES MOVILES	APLICACIONES		
ABSORCION	Gel de sílice	OH OH -Si - D - Si-	Hexano, cloroformo, isopropanol	Eteres, ésteres, porfirinas, micotoxinas, vitaminas liposolubles		
	Alúmina	Al - D - Al	Hexano, cloroformo, isopropanol	Aminas		
REFRATO	FASE NORMAL	FASES EMBAJADAS	Amino	-NH ₂	Hexano, cloroformo, isopropanol	Azúcares, esteroides, nitro- derivados
			Ciano	-CN	Hexano, cloroformo, isopropanol	Nitroderivados, aminoácido.
	Dial		Glicidoxetil- metoxisilano	Agua, Na ₂ HPO ₄ 0.1 M	Proteínas, péptidos, tenso- activos acuosos	
	RP-2		Dimetilsilano	Agua, acetónitrilo, metanol	Aminas, fenoles, vitaminas hidrosolubles	
FASE INVERSA	RP-8,	Octilsilano	Agua, acetónitrilo, metanol	Catcolaminas, esteroides, aceites esenciales		
	RDS-18,	Octadecilsilano	Agua, acetónitrilo, metanol	Analgésicos, fitatos, aro- máticos polinucleares		
INTERCAMBIO IONICO	Intercambiador fuerte de cationes	Acido sulfónico	Na ₂ HPO ₄ 0.01-0.3 M	Vitaminas hidrosolubles, purinas, aminoácidos, nu- cleótidos		
	Intercambiador fuerte de aniones	Amonio cuaternario	Na ₂ HPO ₄ 0.01-0.1 M	Nucleótidos		
	Intercambiador débil de aniones	-NH ₂	H ₂ PO ₄ 0.01-0.05 M	Colorantes comestibles, carbohidratos		
EXCLUSIVAS	Gel acuoso	Divinilbenceno sulfonado	Agua	Proteínas, péptidos, azú- cares		
	Gel orgánico	Divinilbenceno	Cloroformo, THF	Polímeros, gomas		
	Sílice de poro controlado	Gel de sílice	THF, alcoholes, agua	Polímeros, compuestos biológicos		
	Vidrio de poro controlado	Vidrio poroso	THF, alcoholes agua	Compuestos biológicos		

CROMATOGRAFIA DE FASE INVERSA

El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o un alcohol (metanol); en este caso mientras más apolar sea la muestra mayor será su tiempo de retención.

En la siguiente figura se presentan estos procesos, así como, el orden de elución de los distintos componentes de la muestra en función de sus polaridades.^{22,23}

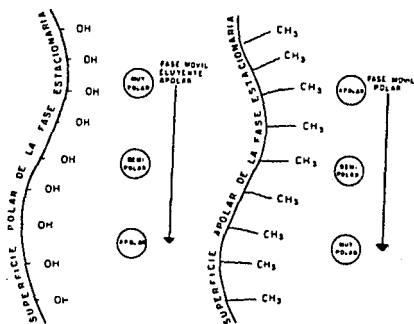


Ilustración gráfica de la Cromatografía líquida en fase normal y fase inversa, representa los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indicando su orden en elución.

CROMATOGRAFIA DE FASE ENLAZADA

La ventaja principal que ofrece la cromatografía de fase enlazada, es que los rellenos de las columnas son más estables que los usados en cromatografía líquido líquido, ya que la fase estacionaria está unida químicamente al soporte y no puede ser movida fácilmente durante su uso. Con este tipo de rellenos es posible usar disolventes dentro de un intervalo de pH de 2.0 a 8.5. Algunos materiales de relleno pueden soportar temperaturas mayores a los 80°C, aún cuando los más comunes a utilizar son temperatura ambiente y 60°C.

Existe una amplia variedad de rellenos de fase enlazada a diferentes grupos funcionales que permiten llevar a cabo cromatografía de fase normal o fase inversa.

En cromatografía de fase normal se usan rellenos polares de la misma manera que los adsorbentes para cromatografía líquido-líquido (ej. sílica).

Es posible efectuar separaciones de muestras que contienen sustancias de polaridad moderada o polaridad fuerte mediante el uso de fase inversa (ej. C_8 o C_{18}), en conjunción con fases móviles acuosas polares para separar una variedad amplia de solutos menos polares.

Los compuestos de carácter iónico se pueden separar mediante la cromatografía de pares iónicos.

La cromatografía de fase enlazada es particularmente útil para separar componentes con pesos moleculares diferentes (ej. homólogos), siempre y cuando el peso molecular sea menor a 3000.

El mecanismo de retención no se ha establecido definitivamente. Se supone que las moléculas de la muestra se adsorben en la superficie de la cubierta orgánica que cubre la sílica, o bien que las moléculas de la muestra se adsorben dentro de una fase "líquida", definida por la cubierta orgánica y las

moléculas asociadas a la fase móvil.

En el caso de un mecanismo de adsorción se supone que las moléculas de la muestra y el solvente compiten por un lugar en la superficie orgánica.

Se ha sugerido que los sustituyentes dimetilalquilo en los rellenos de fase inversa pueden actuar como cristales líquidos formando una fase líquida ordenada. Otra sugerencia es que la cubierta orgánica embebe ciertos componentes de la fase móvil para formar una fase estacionaria líquida convencional.

Es conveniente considerar a la fase orgánica enlazada, como si fuera equivalente a una fase líquida, sostenida mecánicamente en una fase sólida.

ELECCION DE LA FASE MOVIL

Los valores de K' para los solutos se controlan generalmente cambiando la fuerza eluyente de la fase móvil, o bien variando la fase estacionaria.

La combinación de la fase móvil y estacionaria controla el rango total de los valores de K' del soluto para un sistema particular de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR); la fase móvil se puede variar sistemáticamente para optimizar los factores de separación. Otro factor que hay que tomar en cuenta es la selectividad del disolvente, la cual está dada por sus características químicas (momento dipolo, aceptores o donadores de electrones).

La fuerza del disolvente se controla mediante P' (polaridad de Snyder).

El valor de P' varía de 2.0 a 10.2. Mientras mayor sea este valor, mayor será la polaridad del disolvente. Al aumentar P' en la cromatografía de fase normal, aumenta la fuerza de la fase móvil y disminuyen los factores de

capacidad K' de los componentes de la muestra.

La siguiente ecuación muestra la relación entre K' y P'

$$\frac{K'_2}{K'_1} = 10 (P'_1 - P'_2) / 2$$

Donde K'_2 y K'_1 , son los valores inicial y final de K' para un compuesto dado y P'_1 y P'_2 , se refieren a los valores inicial y final de P' .

Las fases móviles usadas en este tipo de cromatografía están constituidas por mezclas de disolventes hidrocarbonados con hexano, heptano o isooctano y cantidades pequeñas de otro de mayor polaridad.

La fuerza de la fase móvil se puede modificar variando la concentración del disolvente más polar.

Para cromatografía en fase inversa la ecuación es la siguiente:

$$\frac{K'_2}{K'_1} = 10 (P'_2 - P'_1) / 2$$

Las fases móviles usadas en fase inversa están usualmente constituidas por agua a la cual se le adicionan concentraciones variables de disolventes orgánicos miscibles con metanol, tetrahidrofurano, etcétera.

Otra alternativa para ambas clases de cromatografía es el uso de fases terciarias e incluso cuaternarias.

El pH puede cambiar la selectividad de la separación para solutos ionizados o ionizables, puesto que las moléculas cargadas se distribuyen perfectamente en la fase acuosa o en la más polar, por lo cual es posible controlar el coqueo de los picos amortiguando la fase móvil, o bien adicionando pequeñas cantidades de ácidos minerales (acético, fosfórico, etc.).

En ciertas ocasiones se adicionan, en cromatografía de fase inversa, algunas sales a la fase móvil con el fin de variar el tiempo de retención del soluto, la selectividad o bien mejorar la simetría del pico.

"DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO POR CLAR"

Para el desarrollo de un método analítico por CLAR generalmente se siguen una serie de pasos³⁰, entre los cuales se encuentran:

1. Investigación Bibliográfica
2. Investigación de propiedades físicas y químicas de las sustancias a separar.
 - Peso molecular
 - Solubilidad
 - Polaridad
 - Espectro de absorción visible y ultravioleta
 - Naturaleza química (ácido, base, sal, amina, etc.)
 - Coefficiente de partición
 - Propiedades electroquímicas
 - Índice de refracción
 - Estabilidad
3. Selección del tipo de "CLAR" en base a la investigación anterior
4. Selección del detector
5. Desarrollo del sistema con el fin de:
 - Evitar presiones elevadas que pueden dañar las columnas y el equipo
 - Obtener tiempos de retención cortos
 - Obtener factores de resolución mayores de dos
 - Obtener un método con una tolerancia adecuada
 - Obtener un método de costo aceptable
6. Preparación de la muestra
7. Procedimiento de validación estadística
8. Comprobación de resultados contra los obtenidos por métodos ya establecidos.

2.9 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Una definición de validación aplicable a la industria farmacéutica es la siguiente:

VALIDACION:

Es el procedimiento mediante el cual se documentan pruebas de que un proceso de manufactura o un método de análisis rinde lo que de ellos se espera, o se requiere.

De las disposiciones legales vigentes que prescriben la validación de métodos analíticos, se encuentra la reglamentación de la "FDA" en el "CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICES" (CGMP_s).

Sección 211.165 (e)

Deberán establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos de prueba empleados.

Para validar un método analítico es necesario considerar los siguientes parámetros:

1. Linearidad
2. Repetibilidad
3. Especificidad
4. Precisión
5. Exactitud
6. Sensibilidad (cantidad mínima detectable)
7. Reproducibilidad
8. Tolerancia (robustez)
9. Estabilidad de la muestra

LINEARIDAD:²⁹

Se dice que un método es lineal en un determinado intervalo de concentraciones cuando al graficar la respuesta contra concentración se obtiene una línea recta.

DEL ESTANDAR:

Preparar por duplicado muestras del estándar del fármaco en un disolvente adecuado de tal manera que se tengan concentraciones al 50, 75, 100, 125 y 150% de la concentración del procedimiento normal de análisis. Promediar los valores obtenidos para cada punto y graficar respuesta contra concentración.

Determinar el coeficiente de correlación (grado de concordancia entre dos variables). Cuanto más cercano se encuentre a uno el valor de correlación "r" y la serie de puntos en la gráfica, se asemeje a una recta, más lineal será el método. Calcular la pendiente (sensibilidad), y el intercepto (ordenada al origen).

Cuando la desviación de cada punto con respecto a la linearidad no afecte a los resultados en la región normal de análisis, por más de 1% el método puede considerarse también lineal, y en este caso podrá usarse un solo nivel de concentración para el estándar de referencia en cada análisis, el cual deberá estar preferentemente en el nivel esperado.

DE LA MUESTRA:

Consiste en verificar si la muestra sigue el mismo comportamiento lineal que la referencia en un rango determinado.

Los datos obtenidos en la exactitud del método pueden emplearse para esta evaluación, para ello se grafican los mg adicionados con los mg recuperados.

rados (promedio de cada nivel), se calcula el coeficiente de correlación "r" la pendiente "m" y la ordenada al origen "b".

Criterio:

$$r = 1$$

$$b = 0$$

$$m = 1$$

REPETIBILIDAD:³⁰

En la repetibilidad de un método se estudia la concordancia obtenida en tre determinaciones independientes desarrolladas en un mismo laboratorio con el mismo analista y equipo. La repetibilidad debe ser determinada con una cantidad no menor a seis análisis y si un punto se sale fuera de los límites deberán realizarse análisis adicionales, si es más de un punto, el método necesita revisión.

Para realizar la prueba se preparan concentraciones del placebo con 85, 100 y 115% del activo (el valor teórico y los límites o concentraciones cercanas a estas últimas), se analiza 6 veces cada concentración y se reportan los mg agregados y el % de recuperación. A partir de estas se calculan los siguientes parámetros estadísticos; media, desviación estandar relativa, error estándar y límites de confianza.

ESPECIFICIDAD:²⁹

Un método es específico cuando sólo detecta a la sustancia de interés en presencia de otras sustancias (otro activo, excipientes, productos de degradación, metabolitos etc.). Cuando se trata de estabilidad un método es específico cuando detecta la sustancia de interés sin interferencia de sus productos de degradación.

- a) Para evaluar la especificidad en la estabilidad se puede seguir la siguiente metodología para acelerar el proceso de degradación eligiendo las variantes de acuerdo a las características del fármaco. Colocar por duplicado muestras del producto, placebo y referencia en frascos de vidrio con tapa. Si se trata de formas farmacéuticas sólidas en algunos casos es conveniente triturar la muestra o adicionar pequeñas cantidades de agua:

Someter al producto a las siguientes condiciones:

1. 7 días a 60°C modificando el pH de la muestra:
 - a) Adicionar al frasco con muestra 2-5 ml de HCL 10%
 - b) Adicionar al frasco con muestra 2-5 ml de NaOH 10%
2. 15 días a 60°
3. 15 días a temperatura ambiente expuesto a la luz
4. 15 días a temperatura ambiente protegido de la luz
5. 7 días a 60°C con una atmósfera al 75% de humedad relativa.

En caso de activos termolábiles pueden modificarse las temperaturas de calentamiento.

- b) Comparar la respuesta del producto placebo y referencias sometidas a estas condiciones, con la respuesta del producto placebo y referencia que permanece en condiciones normales. Si se presentan productos después de haber sido sometidos a las condiciones de prueba, estos no deberán dar respuestas a las mismas condiciones analíticas del fármaco.
- c) Realizar el método con un placebo: El placebo no deberá dar respuesta bajo las mismas condiciones analíticas del fármaco en estudio.

PRECISION:³⁰

Es el grado de concordancia de mediciones repetidas de una misma propiedad, los cuales reflejan la variabilidad de la respuesta.

- a) Del sistema: Preparar un estándar de referencia al 100% del procedimiento normal de análisis y medir la respuesta del sistema en seis ocasiones.

En determinaciones espectrofotométricas es conveniente determinar la respuesta cada hora durante 6 hrs. empleando el mismo estándar. La variabilidad de la respuesta está dada por el coeficiente de variación.

$$C.V. (\%) = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

DONDE:

CV = Coeficiente de variación

S = Desviación estándar

\bar{X} = Promedio de las determinaciones

- b) Del método: Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el método de prueba en una serie de determinaciones.

Para evaluar la precisión del método determinar el coeficiente de variación (CV), y la desviación estándar de las seis muestras usadas en exactitud al 100%.

EXACTITUD:

Es el grado de concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor que se presume como real (100%).

- a) Para determinar la exactitud del método se preparan placebos adicionales con el 85, 100 y 115% de la cantidad de fármaco etiquetado en el producto, se preparan seis muestras de cada porcentaje y se reportan los mg adicionados contra los mg recuperados, el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el CV. Los resultados obtenidos se evalúan estadísticamente, empleando la prueba de t de Student.
- b) Efecto placebo. Se preparan placebos de 50, 100 y 150% de la cantidad empleada en el análisis y se adiciona a cada uno el % del fármaco. Se analizan por duplicado el mismo día en que se aplica la prueba de exactitud. Se grafican los valores promedio y desviación estándar obtenidos en la prueba de exactitud así como los datos obtenidos en la prueba y se determina el coeficiente de correlación, intercepto y la pendiente; se observa la gráfica. Si se presenta la forma de una línea recta y si se obtiene un coeficiente de correlación lo más cercano a uno, se puede decir que no hay efecto del placebo.

Para los cálculos se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\text{mg recuperados} = \frac{\text{respuesta del problema} \times \text{peso de referencia (mg)}}{\text{respuesta de la referencia}}$$

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{mg recuperados} \times 100}{\text{peso de referencia (mg)}}$$

$$\text{Diferencia} = df = \text{mg adicionados} - \text{mg recuperados}$$

$$Xdf = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{df}{n}$$

$$Xa : X = 100$$

$$Xo : X \neq 100$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X} \text{ df } \sqrt{n}}{\text{sdf}}$$

Donde:

n = No. de determinaciones

\bar{X} df = Promedio de las diferencias

sdf = Desviación estándar de las diferencias

Criterio: $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$, para que el método sea considerado exacto.

$$IC \propto_{0.05} = X (\%) \pm \frac{S \ T \ \text{tablas}}{\sqrt{n}}$$

$\propto = 0.005$ para métodos microbiológicos

SENSIBILIDAD:

Es la cantidad mínima detectable en forma cuantitativa. Se determina midiendo la respuesta de diluciones del estándar preparado al 100% del procedimiento normal de análisis midiendo la respuesta y evaluando los resultados, la mínima respuesta medible, en forma cuantitativa será la cantidad mínima detectable.

El ruido del aparato deberá ser cuando más 4 veces menor a la mínima señal detectable.

REPRODUCIBILIDAD:³⁰

Es la concordancia obtenida entre las determinaciones desarrolladas en diferentes laboratorios, realizados por diferentes analistas en diferente equipo, en diferente día, etc. La reproducibilidad se determina solamente

entre analistas y entre días.

El método propuesto se realizará por triplicado por dos analistas en dos días diferentes con muestras de un solo lote.

Los resultados obtenidos se evalúan utilizando un análisis de varianza de acuerdo a los procedimientos mostrados en las tablas III y IV.

TABLA No. 111

PROCESO DE CALCULO PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ANALITICO

F QUIMICOS	C (DIAS)			TOTAL
	C ₁	C ₂	...C _k	
F1	x 111	x 112	... x 11k	T1
	x 211	x 212 x 21k	

	x n11	x n12 x n1k	
F2	x 121	x 122 x 12k	T2
	x 221	x 222 x 22k	

	x n21	N n22 x n2k	
TOTAL	T.1	T.2 Tk	T

Criterio:

Si $\frac{MCF}{Mce} >$ F tablas existen diferencias estadísticamente significativas entre químicos.

Si $\frac{MCC}{Mce} >$ F tablas existen diferencias estadísticamente significativas entre muestras.

Por lo tanto el método no es reproducible.

Donde:

MCF = Cuadrado medio entre analistas.

MCC = Cuadrado medio entre muestras.

TABLA No. IV

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA DETERMINAR REPRODUCIBILIDAD

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS S.C.	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	F COCIENTE
FILA F	$\sum_{j=1}^J \frac{T_j \cdot 2}{nk} - \frac{T^2}{N}$	J - 1	$\frac{SCF}{J-1}$	$\frac{MCF}{MCC}$
COLUMNA C	$\sum_{k=1}^K \frac{T \cdot k}{nJ} - \frac{T^2}{N}$	K - 1	$\frac{SCC}{K-1}$	$\frac{MCC}{MCC}$
INTERAC-CION I	$\frac{T^2}{N} - \sum_{j=1}^J \frac{T_j \cdot 2}{nk} - \sum_{k=1}^K \frac{T \cdot k^2}{nJ} + \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K \left(\sum_{l=1}^n x_{ljk} \right)^2$	(J-1)(K-1)	$\frac{S C I}{(J-1)(K-1)}$	$\frac{MCI}{Mce}$
ERROR e	$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K x^2_{ijk} - \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K \left(\sum_{l=1}^n x_{ljk} \right)^2$	JK(N-1)	$\frac{SCe}{JK(n-1)}$	
TOTAL T	$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K x^2_{ijk} - \frac{T^2}{N}$	N - 1		

Donde:

Fila F = Analistas

Columna C = Muestras

Nota:

El método se considera totalmente válido cuando haya sido probado en cinco lotes de fabricación o para análisis de pruebas de estabilidad.

ESTABILIDAD:³⁰

Es necesario considerar las posibles condiciones de almacenamiento a las que pudiera estar expuesta la muestra, por lo que antes de medir su respuesta generalmente se determina su estabilidad, cuando se conserva a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración (0°C).

Se pueden utilizar las muestras preparadas para exactitud marcándolas con iniciales dividiendo la solución en cuatro porciones y guardándolas en viales cerrados, o tubos con tapón conservándolos en las siguientes condiciones:

Temperatura ambiente (24 y 72 hrs.)
Refrigeración (72 y 168 hrs.)

Medir la respuesta de las soluciones al cabo de los tiempos de almacenaje. Efectuar una prueba de "t" comparando la respuesta obtenida contra la respuesta inicial empleando los siguientes cálculos (usar absorbancias, % de recobro, etc.).

Diferencia = df = respuesta inicial - respuesta después de X tiempo.

$$\bar{X}df = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{df}{n} \qquad sf = \frac{df^2 - (D)^2 / n}{n-1}$$

$$T_{exp} = \frac{\bar{X} df \sqrt{n}}{sdf}$$

Ho: $\bar{X} = 100$

Ho: $\bar{X} \neq 100$

CRITERIO:

$$T_{exp} \leq T_{tablas}$$

para que la muestra sea considerada estable

Donde:

\bar{X}_{df} = Promedio de las diferencias

n = Número de determinaciones

sdf = Desviación estándar de las diferencias

III. PARTE EXPERIMENTAL

A continuación se mencionan las condiciones instrumentales y cromatográficas utilizadas en el estudio:

A) INSTRUMENTO	Cromatografo de líquidos "WATERS"
Columna	μ Bondapak C ₁₈ fase inversa, 30 cm x 3.9 mm de diámetro interno, de acero inoxidable.
Inyector	Automático "WATERS" WISP 710B.
Bomba	Modelo 6000 A "WATERS"
Detector	Ultravioleta longitud, de onda variable modelo 450 "WATERS".
Registrador (Integrador)	Modelo M-730 marca "WATERS"
Fase Móvil	Metanol: Acetato de Sodio 0.005 M pH 2.5 (55:45)
Flujo de la fase móvil	1.2 ml/min.
Volumen de inyección	5 μ l.
Longitud de onda	232 nanómetros
Velocidad de carta	0.3 cm/min.
Tiempos de retención	Producto de degradación ácido-4-cloro-5-sulfamoilantranílico: aproximadamente 2.8 min. Furosemida aprox. 5.54 min. Estándar interno (Tolbutamida) aprox. 8.9 min.

B) REACTIVOS

Agua grado HPLC J.T. Baker
Metanol grado HPLC J.T. Baker
Acetato de Sodio R.A. J.T. Baker
Acido Clorhídrico R.A. J.T. Baker
Furosemida grado USP
Tolbutamida grado USP
Acido-4-cloro-5-sulfamoiilantranílico grado USP

C) METODO

a) Solución Estándar

Se pesan exactamente 10 mg. de Furosemida USP y se llevan a 10 ml con metanol conteniendo el estándar interno (Tolbutamida) en conc. de 4 mg/ml, se agita durante 30 seg. en un agitador Vortex, se toma 1 ml de esta solución, se lleva a 10 ml con metanol: agua (45:55) y se inyectan al cromatógrafo 5 µl. (Diagrama No. 1).

b) Para inyectables

Se toman 10 inyectables, cada inyectable contiene 20 mg de Furosemida, se homogeniza la solución, se toma el equivalente a 10 mg de Furosemida y se lleva a 10 ml con metanol conteniendo el estándar interno; se homogeniza durante 30 seg. en un agitador Vortex, se toma 1 ml de esta solución, se lleva a 10 ml con metanol: agua (45:55) y se inyectan al cromatógrafo 5 µl. (Diagrama No. 2).

c) Para tabletas

Se pesan 20 tabletas, cada tableta contiene 40 mg de Furosemida, estas se trituran hasta polvo fino, se toma el equivalente a 10 mg de Furosemida y se le adicionan 10 ml. de metanol conteniendo el estándar interno, se agita durante 30 seg. en un agitador Vortex, se cen

trifuga durante 5 min. a 3000 rpm. Se toma 1 ml del sobrenadante se lleva a 10 ml con metanol: agua (45:55) y se inyectan 5 μ l al cromatógrafo (Diagrama No. 3).

DETERMINACION DE FUROSEMIDA (ESTANDAR) POR "CLAR"

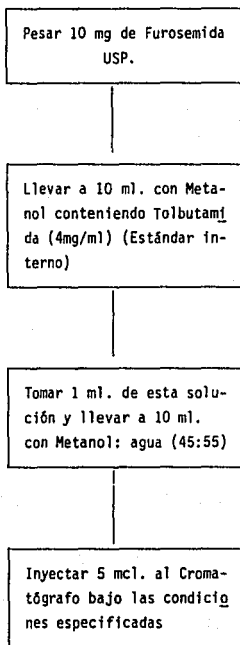


DIAGRAMA No. 1

DETERMINACION DE FUROSEMIDA EN INYECTABLES POR "CLAR"

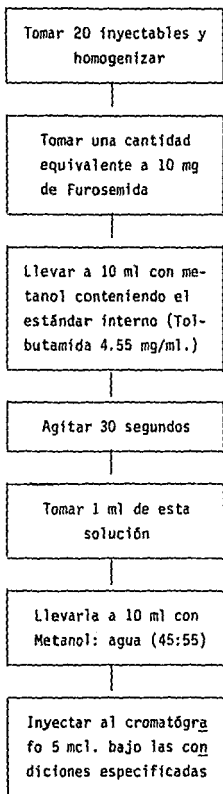


DIAGRAMA No. 2

DETERMINACION DE FUROSEMIDA EN TABLETAS POR "CLAR"

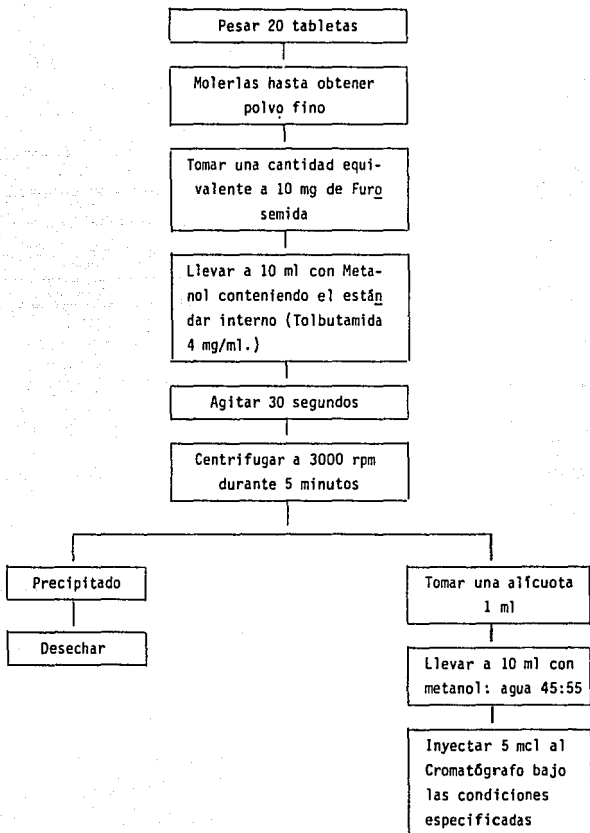


DIAGRAMA No. 3

VALIDACION DEL METODO:

Los parámetros utilizados para la validación del método fueron los siguientes:

LINEARIDAD:

- a) Del estándar: Se prepararon por triplicado muestras del estándar de Furosemida en metanol: agua (45:55), para obtener las siguientes concentraciones 30, 60, 90, 120, 150 mcg/ml. y se siguió el procedimiento descrito en el diagrama No. 1.
- b) De la muestra: Se prepararon muestras por triplicado de Furosemida en sus respectivos placebos o a las mismas concentraciones que las muestras del estándar, para lo cual se siguieron los procedimientos descritos en los diagramas No. 2 y No. 3 respectivamente. Se hicieron los cálculos para obtener la correlación, el intercepto y la pendiente.

REPETIBILIDAD:

Para determinar la repetibilidad, se preparó el estándar de referencia al 100% (0.1 mg/ml), y se midió la respuesta del sistema en 6 ocasiones.

- a) Del método: Para evaluar la repetibilidad se preparó la muestra al 100% (100 mcg/ml) en placebo y se midió la respuesta en 6 ocasiones en dos días diferentes, y se calculó la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación.

EXACTITUD:

Para determinar la exactitud se prepararon 3 concentraciones diferentes 50, 100, 150% (50, 100, 150 mcg/ml). Para cada concentración se realizó la pesada individualmente 6 veces y se trató de acuerdo a los diagramas 2 y 3 respectivamente.

PRECISION:

- a) Del sistema: Se prepararon muestras al 100% (0.1 mg/ml) y se midió la respuesta del sistema en 6 ocasiones.
- b) Del método: Para evaluar la precisión del método se determinó el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar de las 18 muestras usadas en la prueba de exactitud.

ESPECIFICIDAD:

En esta prueba se sometió a la Furosemida a pH extremos los cuales fueron pH = 1 y pH = 14 con el fin de degradar a la Furosemida y observar si los productos de degradación no interfieren en la cuantificación de Furosemida bajo estas condiciones cromatográficas.

SENSIBILIDAD:

Se determinó midiendo la respuesta de diluciones del estándar al 100% (0.1 mg/ml); de ahí se tomó 1 ml y se llevó a 10 ml; de esta solución se tomaron 5 ml y se llevó a 10 ml para obtener una concentración de 5 mcg/ml. De esta solución se inyectaron por sextuplicado 5 mc l al cromatógrafo y se determinó la media, la desviación estándar y el % de coeficiente de variación.

REPRODUCIBILIDAD

Para esta prueba se utilizó la solución estándar de Furosemida al 100% (0.1 mg/ml). Esta prueba se realizó con dos analistas en dos días diferentes, cada analista efectuó el análisis 6 veces.

TOLERANCIA:

En esta prueba se sometió a la Furosemida a pH de 2.7 y pH 3.9 a diferente composición de fase móvil metanol: acetato de sodio 0.005 M (45:55) y

(50:50) respectivamente. En ambas soluciones se reguló el pH con ácido clorhídrico concentrado.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Para esta prueba se utilizó la solución de 0.1 mg/ml de Furosemda, para lo cual se sometieron las soluciones de inyectables y las preparadas a partir de tabletas, a las siguientes condiciones: luz directa del sol, obscuridad y refrigeración durante 5 días.

COMPARACION DE METODOS:

Para esta prueba se hicieron análisis de la Furosemda por el método oficial de la USP XXI y por el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) desarrollado, utilizando para ello diferentes lotes de proveedores del I.M.S.S.

IV. RESULTADOS

4.1 LINEARIDAD:

En las figuras No. 6, 7 y 8 se presenta la linealidad del método en el rango de concentración de 30-150 mcg/ml. A partir de estos datos se calculó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de regresión lineal.

4.2 REPETIBILIDAD:

Los valores de repetibilidad se presentan en las tablas No. V, VI, VII y VIII a partir de los cuales se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

4.3 EXACTITUD:

En las tablas IX a XIV se encuentran los resultados obtenidos a las siguientes concentraciones: 50, 100 y 150 mcg/ml. que equivale al 50, 100 y 150% tanto para inyectables como para tabletas y se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Con el fin de observar si los placebos no interferían en el análisis, se elaboró la figura No. 9, a partir de la cual se calculó, la pendiente, el intercepto y la correlación.

4.4 PRECISION:

Los valores obtenidos están reportados en las tablas No. XV, XVI y XVII tanto para el sistema, como para inyectables y tabletas. En cada caso se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

4.5 ESPECIFICIDAD:

En la figura No. 10 se presentan los cromatogramas que se obtuvieron al

analizar placebo de inyectables y tabletas en la figura No. 11 se observan los cromatogramas que se obtuvieron al analizar Furosemida en medio ácido y medio alcalino y en la fig. No. 12 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar Furosemida, estándar interno (Tolbutamida) y el ácido-4-cloro-5-sulfamoilantranfílico producto de degradación de la Furosemida.

4.6 SENSIBILIDAD:

La tabla No. XVIII presenta los resultados obtenidos para una concentración de 5 mcg/ml de Furosemida, a partir de los cuales se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

4.7 REPRODUCIBILIDAD:

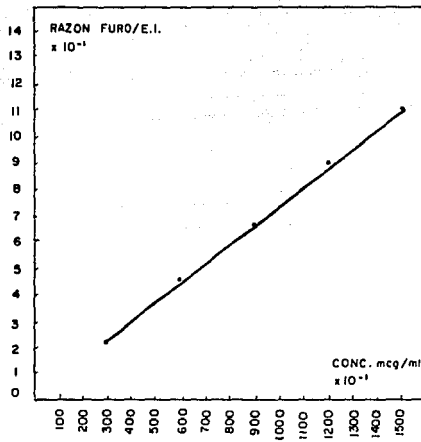
Los resultados de ambos análisis se concentran en la tabla XIX.

4.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:

Los resultados obtenidos se encuentran en las tablas XX y XXI para inyectables y tabletas respectivamente.

4.9 COMPARACION DE METODOS:

En la tabla XXII se presentan los resultados obtenidos, utilizando el método de la USP XXI y el método propuesto (CLAR) para inyectables, y en la tabla XXIII los resultados obtenidos para tabletas utilizando el método de la USP XXI y el método propuesto (CLAR).

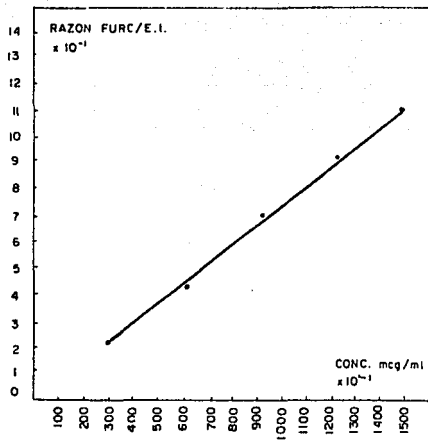


DATOS

Conc. mcg/ml $\times 10^{-1}$	Razon FURO/E.I. $\times 10^{-1}$
300.000	2.128
600.000	4.421
900.000	6.497
1200.000	8.804
1500.000	10.772

PENDIENTE = 0.0072
INTERCEPTO = 0.0231
FACTOR DE CORRELACION = 0.9997

FIG. No.6 LINEARIDAD DEL ESTANDAR DE FUROSEMIDA.

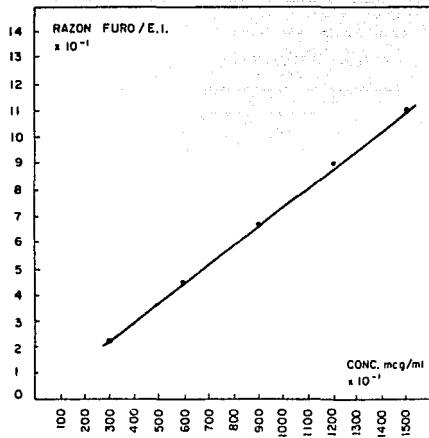


DATOS

Conc. mcg/ml $\times 10^{-1}$	Razon FURC/E.I. $\times 10^{-1}$
300.000	1.968
600.000	4.048
900.000	6.774
1200.000	8.985
1500.000	10.950

PENDIENTE = 0.0076
INTERCEPTO = 0.3253
FACTOR DE CORRELACION = 0.9988

FIG. No. 7 LINEARIDAD DE FUROSEMIDA EN PLACEBO PARA INYECTABLES.



DATOS

Conc. mcg/ml $\times 10^{-1}$	Razon FURO/E.I. $\times 10^{-1}$
300.000	2.221
600.000	4.474
900.000	6.630
1200.000	8.955
1500.000	10.903

PENDIENTE = 0.0072

INTERCEPTO = 0.0807

FACTOR DE CORRELACION = 0.9996

TABLA No. V

Repetibilidad del método primer día por CLAR para inyectables
utilizando una concentración de 100 mcg/ml de Furosemida

MUESTRA	AREA FUROSEMIDA	AREA E.I. TOLBUTAMIDA	AREA FURO/ AREA E.I.	%
ST	14255.60	19602.65	0.7272	100
1	14505.45	20120.65	0.7209	99.13
2	14652.35	20275.05	0.7226	99.36
3	14875.80	20128.55	0.7390	101.62
4	14853.25	20243.55	0.7337	100.89
5	14570.55	20356.30	0.7157	98.41
6	14576.10	20054.30	0.7268	99.94

$$\bar{X} = 99.89$$

$$\sigma = 1.1869$$

$$\%CV = 1.18$$

TABLA No. VI

Repetibilidad del método segundo día por CLAR para inyectables
utilizando una concentración de 100 mcg/ml de Furosemida

MUESTRA	AREA FUROSEMIDA	AREA E.I. TOLBUTAMIDA	AREA FURO/AREA E.I.	%
ST	14826.22	20020.60	0.7405	100
1	14743.30	20045.25	0.7355	99.32
2	14381.75	19725.60	0.7290	98.44
3	14613.50	19896.10	0.7344	99.17
4	14826.85	20361.80	0.7281	98.32
5	14531.90	20093.10	0.7232	97.66
6	14554.70	20063.90	0.7254	97.96

$$\bar{X} = 98.47$$

$$\sigma = 0.6560$$

$$\%CV = 0.66$$

TABLA No. VII

Repetibilidad del método primer día por CLAR para tabletas
utilizando una concentración de 100 mcg/ml de Furosemida

MUESTRA	AREA FUROSEMIDA	AREA ESTANDAR I	AREA FURO/ AREA E. I.	%
ST	14255.6	19602.65	0.7272	100
1	14838.20	20514.75	0.7232	99.44
2	15140.65	20551.70	0.7367	101.30
3	14688.05	20309.95	0.7231	99.43
4	14930.55	20309.95	0.7351	101.08
5	14688.05	20309.95	0.7231	99.43
6	14113.30	19664.50	0.7177	98.69

$$\bar{X} = 99.89$$

$$\sigma = 1.0459$$

$$\%CV = 1.047$$

TABLA No. VIII

Repetibilidad del método segundo día por CLAR para tabletas
utilizando una concentración de 100 mcg/ml de Furosemida

MUESTRA	AREA FUROSEMIDA	AREA ESTANDAR I	AREA FURO/ AREA E. I.	%
ST	14826.22	20020.60	0.7405	100
1	14676.30	19993.85	0.7340	99.12
2	14965.35	20273.90	0.7381	100.55
3	15277.20	20501.20	0.7451	100.62
4	15399.45	20459.30	0.7526	101.63
5	15438.60	20598.80	0.7494	101.20
6	15358.10	20556.00	0.7471	100.89

$$\bar{X} = 100.66$$

$$\sigma = 0.8565$$

$$\%CV = 0.85$$

TABLA No. IX
 Determinación de la exactitud de Furosemida en Inyectables
 utilizando una concentración de 50 mcg/ml

MUESTRA	MG ARADIDOS	MG RECUPERADOS	% ARADIDO	% RECUPERADO
1	5.01	4.0955	100.2	97.91
2	5.0	4.9665	100.0	99.33
3	5.01	5.0640	100.2	101.28
4	5.0	5.0010	100.0	100.02
5	5.0	5.0185	100.0	100.37
6	5.0	5.0265	100.0	100.53

\bar{X} = 99.90 σ = 1.1680 %CV = 1.16

TABLA No. X
 Determinación de la exactitud de Furosemida en Inyectables
 a una concentración de 100 mcg/ml

MUESTRA	MG ARADIDOS	MG RECUPERADOS	% ARADIDO	% RECUPERADO
1	10.0	9.9180	100.0	99.18
2	10.0	10.2950	100.0	102.05
3	10.0	9.9300	100.0	99.30
4	10.0	10.1250	100.0	101.25
5	10.0	10.1180	100.0	101.18
6	10.0	9.9910	100.0	99.91

\bar{X} = 100.47 σ = 1.1794 %CV = 1.17

TABLA No. XI
 Determinación de la exactitud de Furosemda en Inyectables
 utilizando una concentración de 150 mcg/ml

MUESTRA	MG AÑADIDOS	MG RECUPERADOS	% AÑADIDO	% RECUPERADO
1	15.01	15.4155	100.06	102.77
2	15.0	15.2880	100.0	101.92
3	14.99	14.8095	99.93	98.73
4	15.0	15.1680	100.0	101.12
5	15.0	14.7120	100.0	98.08
6	15.0	15.3525	100.0	102.32

\bar{X} = 100.82 σ = 1.9610 %CV = 1.94

TABLA No. XII
 Determinación de la exactitud de Furosemda en tabletas
 utilizando una concentración de 50 mcg/ml

MUESTRA	MG AÑADIDOS	MG RECUPERADOS	% AÑADIDO	% RECUPERADO
1	5.01	5.0187	100.2	100.37
2	5.0	4.8960	100.0	97.92
3	5.0	4.8990	100.0	97.98
4	5.0	4.9330	100.0	98.66
5	5.0	5.0045	100.0	100.09
6	5.01	5.0710	100.2	101.42

\bar{X} = 99.40 σ = 1.4318 %CV = 1.44

TABLA No. XIII
 Determinación de la exactitud de Furosemida en tabletas
 utilizando una concentración de 100 mcg/ml

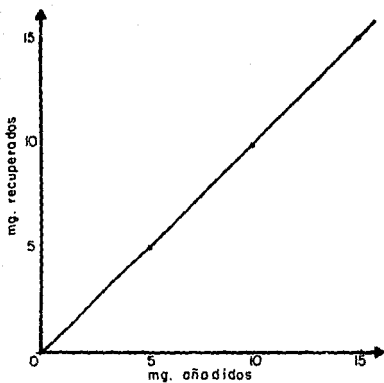
MUESTRA	MG ARADIDOS	MG RECUPERADOS	% ARADIDO	% RECUPERADO
1	10.0	9.9690	100.0	99.69
2	10.0	9.9890	100.0	99.89
3	10.0	9.9430	100.0	99.43
4	10.01	9.9370	100.1	99.37
5	10.0	10.0500	100.0	100.50
6	10.0	9.9890	100.0	99.89

\bar{X} = 99.79 σ = 0.4098 %CV = 0.41

TABLA No. XIV
 Determinación de la exactitud de Furosemida en tabletas
 utilizando una concentración de 150 mcg/ml

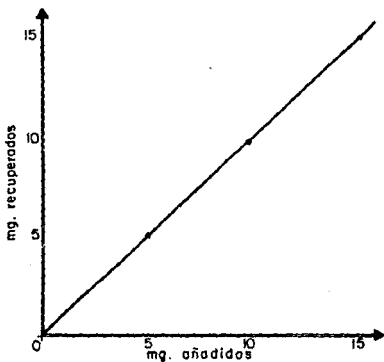
MUESTRA	MG ARADIDOS	MG RECUPERADOS	% ARADIDO	% RECUPERADO
1	15.0	14.8875	100.0	99.25
2	15.01	14.6985	100.6	97.99
3	15.0	14.5200	100.0	96.80
4	15.0	14.6550	100.0	97.70
5	15.0	14.6415	100.0	97.61
6	15.01	14.6955	100.06	97.97

\bar{X} = 97.88 σ = 0.7960 %CV = 0.81



A) Inyectables

Correlación: 0.99999
 Pendiente : 1.01322
 Intercepto: 0.07759



B) Tabletas

Correlación: 0.9998
 Pendiente : 0.96679
 Intercepto : 0.18713

Fig. No. 9

A) Gráfico del efecto Placebo para inyectables

B) Gráfico del efecto Placebo para tabletas

TABLA No. XV
 Precisión del sistema: Utilizando una concentración de
 100 mcg/ml de Furosemida

MUESTRA	AREA FUROSEMIDA	AREA E.I.	FURO/AREA E.I.	%
ST	15361.30	20635.7	0.7404	100.0
1	15445.70	20720.2	0.7454	100.18
2	15255.70	20480.1	0.7449	100.12
3	15193.10	20366.7	0.7459	100.25
4	15371.90	20456.8	0.7514	100.99
5	14895.50	19952.3	0.7465	100.33
6	15089.60	20185.1	0.7475	100.47

$\bar{X} = 100.39$ $\sigma = 0.3183$ $\%CV = 0.31$

TABLA No. XVI
 Precisión del método: En inyectables, utilizando una concentración de
 100 mcg/ml de Furosemida

MUESTRA	AREA FUROSEMIDA	AREA E.I.	FURO/AREA E.I.	%
ST	14210.60	18952.30	0.7498	100.0
1	13853.666	18626.666	0.7437	99.18
2	14152.10	18492.30	0.7652	102.05
3	13621.90	18293.10	0.7746	99.30
4	14020.667	18465.333	0.7592	101.25
5	13961.50	18399.567	0.7587	101.18
6	13587.767	18134.90	0.7492	99.91

$\bar{X} = 100.4$ $\sigma = 1.179$ $\%CV = 1.10$

TABLA No. XVII

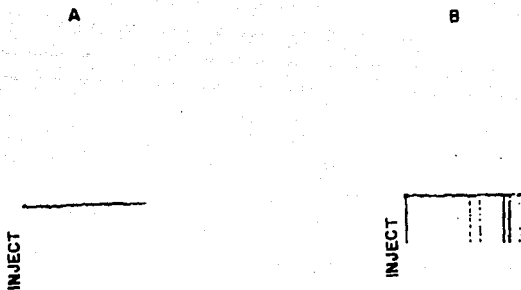
Precisión del método: En tabletas, utilizando una concentración de
100 mcg/ml de Furosemida

MUESTRA	AREA FUROSEMIDA	AREA E.I.	FURO/AREA E.I.	%
ST	13202.00	20200.70	0.6535	100.0
1	13107.05	20116.50	0.6515	99.69
2	12837.55	19662.40	0.6520	99.89
3	12461.80	19177.20	0.6498	99.43
4	12845.55	19555.35	0.6568	100.50
5	12816.10	19733.40	0.6494	99.37
6	12837.55	19662.40	0.6528	99.89

$$\bar{X} = 99.79$$

$$s = 0.409$$

$$\%CV = 0.4$$



ESPECIFICIDAD

FIGURA No. 10

CROMATOGRAMAS OBTENIDOS AL UTILIZAR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA PRESION

A) Placebo de inyectables

B) Placebo de tabletas

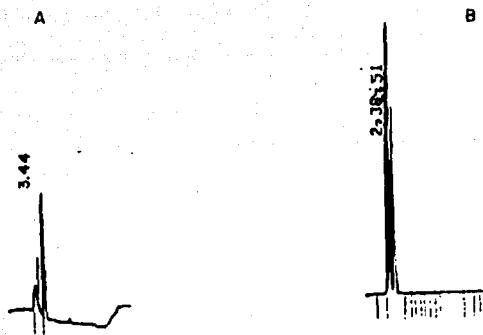


FIGURA No. 11

CROMÁTOGRAMAS OBTENIDOS AL ANALIZAR

A = Furosemida estándar en medio alcalino (pH14)

B = Furosemida estándar en medio ácido (pH1)

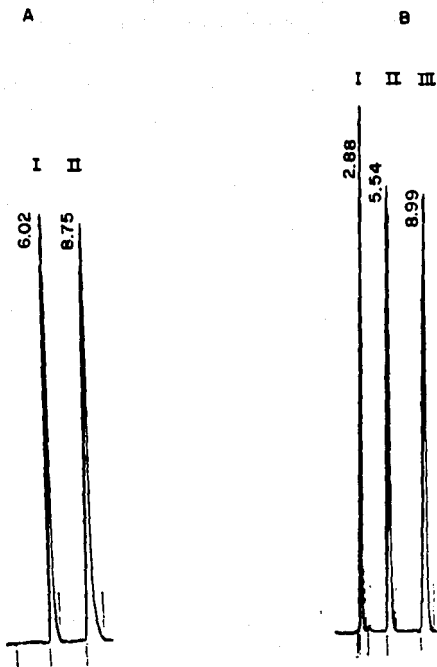


FIGURA No. 12

CROMATOGRAMAS OBTENIDOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE
ALTA RESOLUCION

A = Furosemda (I) y Tolbutamida (II) estándar interno.

B = Producto de degradación Acido-4-cloro-5-sulfamollantranflico (ACS)
(I), Furosemda II y Tolbutamida estándar interno III.

TABLA No. XVIII

Sensibilidad, obtenida a una concentración de 5 mcg/ml de Furosemda

MUESTRA	AREA FUROSEMDA
1	480.55
2	481.37
3	484.65
4	503.07
5	476.46
6	488.04

$$\bar{X} = 485.69 \quad \sigma = 9.3695 \quad \%CV = 1.90$$

TABLA No. XIX

Reproducibilidad del método analítico utilizando una concentración de 100 mcg/ml de Furosemda ambos analistas en los dos días de prueba

DÍA	1	2
Analista I	100.29 %	100.93 %
	99.71 %	100.83 %
	101.23 %	99.16 %
	101.33 %	100.83 %
	101.34 %	103.47 %
DÍA	1	2
Analista II	100.75 %	102.41 %
	100.34 %	99.28 %
	100.66 %	99.18 %
	101.72 %	100.49 %
	97.51 %	100.38 %

$$\bar{X} = 100.74 \quad \sigma = 1.4127 \quad \%CV = 1.40$$

TABLA No. XX

Estabilidad de la muestra, obtenida a partir de una concentración de 100 mcg/ml de Furosemda para inyectables

T/EN DIAS	EXPUESTO A LUZ	OSCURIDAD	REFRIGERACION
0	101.35 %	101.35 %	101.35 %
1	22.99 %	100.08 %	100.21 %
2		100.33 %	98.58 %
3		99.33 %	97.56 %
4		99.90 %	98.76 %
5		99.95 %	98.70 %

TABLA No. XXI

Estabilidad de la muestra de tabletas obtenida a partir de una concentración de 100 mcg/ml de Furosemda

T/EN DIAS	EXPUESTO A LUZ	OSCURIDAD	REFRIGERACION
0	99.0 %	99.0 %	99.0 %
1		98.81 %	97.34 %
2		98.94 %	97.09 %
3		99.36 %	98.07 %
4		99.70 %	98.59 %
5		99.65 %	98.45 %

COMPARACION DE METODOS

TABLA No. XXII

Para inyectables, utilizando el método oficial de la USP XXI
y el método propuesto por "CLAR"

PROVEEDOR	METODO OFICIAL USP XXI	METODO PROPUESTO POR "CLAR"
Hormona	102.30 %	101.29 %
Hormona	100.00 %	99.5 %

TABLA No. XXIII

Para tabletas, utilizando el método de la USP XXI
y el método propuesto por "CLAR"

PROVEEDOR	METODO OFICIAL USP XXI	METODO PROPUESTO POR "CLAR"
Hoechst	103.10 %	101.39 %
Farm. Interamericana	102.36 %	101.90 %
Labimex	99.05 %	98.46 %
Labimex	100.39 %	102.47 %

V. DISCUSION DE RESULTADOS

Sistema Cromatográfico: Inicialmente se probó una columna μ Bondapak CN con una fase móvil de metanol-acetato de sodio 0.005 M pH 2.66 (45:55). Bajo estas condiciones la cantidad mínima detectable fue de 0.1 mcg/ml utilizando un detector de fluorescencia y sulfato de quinina como estándar interno. Se encontraron los siguientes tiempos de retención: 2.5 min. para el ácido-4-cloro-5-sulfamolantranílico, 5 min. para el sulfato de la quinina (E.I.), y 9 min. para la Furosemida, sin embargo el estándar interno no era estable bajo estas condiciones cromatográficas por lo que se cambió el estándar interno a quinina base; el tiempo de retención del estándar aumentó a 7 min. pero también fue inestable bajo estas condiciones.

En base a estos resultados se cambió la columna y el estándar interno; utilizando en este caso clorhidrato de piridoxina como estándar interno y una columna μ Bondapak C₁₈. Se encontraron buenos tiempos de retención de las sustancias a separar, sin embargo, al hacer el análisis de recobro con este estándar se encontró que los valores eran muy variables lo cual pudo deberse a que el estándar interno no se extraía homogéneamente, por lo cual se decidió a cambiar el estándar interno al ácido acetyl salicílico, utilizando un detector de ultra-violeta de longitud de onda variable. Bajo estas condiciones se observó una buena separación de los productos, pero nuevamente se presentó la inestabilidad del estándar interno. Al utilizar la Tolbutamida como estándar, se obtuvieron buenos resultados tanto de estabilidad como de recobro. El pH utilizado fue de 2.50 y como fase móvil metanol: acetato de sodio 0.005 M pH 2.5 (55:45).

Aún en los estudios en los que el estándar interno sufría degradación, la muestra de Furosemida fue estable bajo las condiciones de estudio.

LINEARIDAD: El método propuesto para cuantificar Furosemida en inyectables y tabletas presentó una linealidad satisfactoria en el intervalo de concentración de 30-150 mcg/ml, con un coeficiente de correlación de 0.9997 para el estándar de Furosemida (Fig. No. 6) y 0.99858 para inyectables (Fig. No. 7) y de 0.99968 para tabletas (Fig. No. 8) el cual es adecuado considerando el número de parejas de datos.

REPETIBILIDAD: En la tabla V se presentan los valores obtenidos para inyectables el primer día de prueba de los cuales se obtuvo un coeficiente de variación de 1.18%. En la tabla No. VI, se presentan los valores obtenidos el segundo día de prueba, con un coeficiente de variación de 0.66%. En la tabla No. VII se presentan los valores de tabletas obtenidos el primer día de prueba en la cual se observa un coeficiente de variación de 1.047% y en la tabla No. VIII se presentan los valores obtenidos, el segundo día de prueba en el que se obtuvo un coeficiente de variación de 0.85% en ambos días el coeficiente de variación no fue mayor al 2%. Dado a que el criterio para esta prueba es que el coeficiente de variación no sea mayor al 2% y la prueba cumple con el criterio señalado se puede decir que el método es repetible.

EXACTITUD: Las tablas IX, X y XI presentan los datos obtenidos para inyectables en los cuales se observa un buen recobro a las diferentes concentraciones estudiadas, así a la concentración de 100 mcg/ml. se obtuvo un recobro de 100.47% con un coeficiente de variación de 1.17, los valores obtenidos para tabletas se encuentran en las tablas XII, XIII y XIV en las cuales también se observa un buen recobro (99.79%), con un coeficiente de variación de 0.41%.

El criterio estadístico para esta prueba es de un 98-102% de recobro con un coeficiente de variación menor al 2% y por el cual la prueba cumple con este criterio garantizando con ello la exactitud del método.

PRECISION: La precisión del método es buena ya que el coeficiente de variación para el sistema es de 0.31% (tabla No. XV) el coeficiente de variación para inyectables de 1.17% (tabla No. XVI) y de 0.4% para tabletas (tabla No. XVII). Dado a que el criterio estadístico para determinar una adecuada precisión es que el coeficiente de variación debe ser menor al 2%, esta prueba cumple con este criterio estadístico.

ESPECIFICIDAD: En la fig. 10 se observa que no hay interferencia en los placebos tanto para inyectables como para tabletas. En la fig. No. 11, se observa que cuando se realizan la degradación en medio ácido y en medio alcalino, los productos de degradación no interfieren en el método de valoración, la fig. No. 12 muestra los cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de inyectables y tabletas en el cual se puede observar perfectamente que no hay interferencia con su principal producto de degradación (ácido-4-cloro-5-sulfamolantranílico). En base a ello se considera que el método puede ser útil en estudios de estabilidad.

SENSIBILIDAD: En la tabla XVIII se presentan los datos obtenidos para una concentración de 5 mcg/ml. de Furosemida en el cual se observa una desviación estándar de 9.3695 y un coeficiente de variación de 1.90% estos datos indican que el método es sensible ya que su coeficiente de variación no es mayor al 2%.

REPRODUCIBILIDAD: En la tabla XIX se puede observar que los valores obtenidos por los analistas son muy semejantes. Al efectuar el análisis de varianza (ANAVEVA) (tabla XXIV) se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre días ni entre analistas por lo que se considera que el método es reproducible.

TABLA No. XXIV
 Análisis de varianza (ANAEVA) para los resultados obtenidos
 en la prueba de reproducibilidad

Modelo: $Y_{ijk} = \mu + D_i + A_j + DA_{ij} + E_k(ij)$

FV	gl	SC	CM	F Calculada
D_i	1	0.47	0.47	0.3032
A_j	1	0.57	0.57	0.3677
DA_{ij}	1	1.55	1.55	0.5272
$E_k(ij)$	16	47.06	2.94125	

F Calculada F tablas con significancia de 0.05

Donde:

- M = Media
- D_i = Efecto del dfa
- A_j = Efecto del analista
- DAA_{ij} = Interacción dfa-analista
- gl = Grados de libertad
- SC = Suma de cuadros
- CM = Cuadrado medio
- $E_k(ij)$ = Error experimental

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA: En las tablas XX y XXI se muestran los resultados de la degradación de la Furosemida en inyectables y tabletas respectivamente. En ambos casos se encontró una degradación total a las 48 hrs. al exponerse a la luz. Y se observó así mismo un comportamiento distinto en refrigeración y temperatura ambiente en obscuridad bajo estas condiciones no se presentó degradación.

COMPARACION DE METODOS: En esta prueba solo se utilizaron lotes de proveedores del Seguro Social y se observa en las tablas XXII y XXIII que en general no hay variación de más de 2% entre el método oficial de la USP XXI y el método propuesto tanto para inyectables como para tabletas dando resultados muy semejantes a los obtenidos con el método oficial.

VI. CONCLUSIONES

Se desarrollo un método por HPLC para la cuantificación de Furosemida en inyectables y tabletas. De acuerdo a los resultados obtenidos, el método propuesto presenta las siguientes ventajas:

- 1) Una precisión con un coeficiente de variación de 1.17 para inyectables y de 0.41 para tabletas, los cuales son adecuados para los fines de metodo logfa analitica.
- 2) Confiabilidad en los resultados ya que en los límites de detección alcanzados por el método, se encuentran por debajo de lo marcado en inyectables (20 mg/ 2 ml.) y tabletas (40 mg/tab).
- 3) Una exactitud de 100.47% para inyectables y de 99.79% para tabletas.
- 4) El método es específico ya que es posible separar y cuantificar al principio activo de su principal producto de degradación.
- 5) Estabilidad adecuada de la solución después de 5 días almacenada en refrigeración y a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 6) Una manipulación sencilla con la cual la reproducibilidad de los resultados puede mejorar.
- 7) Un tiempo de análisis corto (30 minutos) en comparación de los métodos oficiales que requieren mínimo 60 minutos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) M. Litler Compendio de Farmacología 4a. ed. El Ateneo. Buenos Aires Argentina (1972): 285-287.
- 2) Goodman y Gilman. Bases Farmacológicas de la terapéutica. 6a. ed. Ed. Panamericana México (1982): 892-901.
- 3) Harrison Thorn Adams, et al. Medicina interna. Tomo II 8a. ed. Ed. La Prensa Mexicana. México (1972): 1398-1399.
- 4) Meyers F. Jawetz E. Manual de Farmacología Clínica. 4a. ed. Ed. Manual Moderno. México (1980): 182-183.
- 5) A.L.M. Kerremans et al. Specimen Handling and High Performance Liquid Chromatographic determination of Furosemide. J. Chromatogr; (1982) 139 129-139.
- 6) Andreasen F. Hansen U. Jansen J. A. The Pharmacokinetics of Furosemide is influenced by Age Br. J. clin pharmac; (1983); 16: 391-397.
- 7) Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 5a. ed. México (1988): 1233-1234.
- 8) The United States Pharmacopoeia 21 th ed. United States Pharmacopoeia Convention Inc. USA 1985.
- 9) Fármacos 1973
México (1973): 147-148.
- 10) The Pharmaceutical codex
11 th. ed. London (1979): 1012

- 11) British Pharmacopoeia Vol. 9 London Her Majesty's Stationary Office (1980): 105.
- 12) Forrey A. W. Kimpel B., et al Furosemide concentrarion in serum an Uri-
ne and it's binding by serum proteins as measured Fluorometrically Clin.
Chem (1974); 20/2 152-158.
- 13) Rao G. Ramana et al. High Pressure Liquid Chromatographic Estimation of
Furosemide in dosage Forms. Indian drug (1985); 22 (4): 217-220.
- 14) Moore E. Douglas and Varavudh Sithipitaks Photolytic Degradation of
Furosemide J. Pharm. Pharmacol (1983); 35: 489-493.
- 15) Roth Rao Jeri S. Rapaka and Vadlamani "HPLC" Procedure for the Analysis
of Furosemide in Pharmaceuticals Analysis of Furosemide tablets and Fu-
rosemide Inyection. Anal. Lett (1981); 14 (B13): 1013-1030.
- 16) Ghanekar A.G. et al. Stability of Furosemide in aqueous systems J. Pharm.
Sci (1978); 67: 808-811.
- 17) Rao S. Rapaka et al. Improved method for the analysis of Furosemide in
plasma by High Performance Liquid Chromatography J. Chromatogr; (1982):
227: 463-469.
- 18) The Merk Index
10 th ed. Merck Co. Inc: 615.
- 19) Clarcke and Berjel. Isolation and Identification of Drugs First ed.
The Pharmaceuticals Press; (1969) V01. I.
- 20) Remingtons Pharmaceuticals Science 17 th ed. Easton Pennsylvania: 883-
943.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 21) Beran John A. et al. Fundamentos de Farmacología. 2a. ed. Ed. Harla México (1976): 409.
- 22) Snyder L. R. Kirkland J.J. Introduction to modern Liquid Chromatography 2a. ed. John Willey & Sons Inc. N.Y. (1979): 126-153.
- 23) R.W. Yost Etre Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica Perkin Elmer (1980): 30-90.
- 24) Martindale the Extra Pharmacopoeia 27 th ed. Ed. Ainye wade London (1977): 554-559.
- 25) Debrecky J. González B. Estudio de estabilidad de diuréticos derivados de las tiazidas. Revista Farmacéutica; (1972): 114: 34-36.
- 26) Cruz J.E. Maness Yakatan. Kinetics and mechanism of hydrolysis of Furosemide Int. J. Pharm; (1979): 2: 275-281.
- 27) Baldew G.S. Vervloet E. Formulation and Shelf-life of a Furosemide injection Ziekenhuisfarmacie; (1986): 2(4): 114-119.
- 28) Ahmad Abdel Kaders Abdel-Moety et al. Flow injection analysis of Pharmaceutical compounds III quantification fo Furosemide with Spectrophotometric detection. Arch Pharm. Chem. Sci. (1986): 14(4): 113-118.
- 29) Ylla-Catalán M. La validación un reto actual: Norma correcta para una validación C.I.F. (1983): 2: 25-28.
- 30) Adrianus J. Vander Wielen et al. Guidelines for assay validation. Pharm. Tech.