



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

47
m

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EVALUACION DEL SISTEMA DE
MULTICOMPONENTES POR CUANTIFICACION
DEL ESPECTRO COMPLETO EN EL ANALISIS
DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS.**

T E S I S

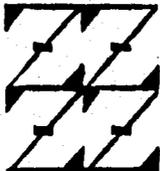
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ANDREA PEGUEROS PEREZ

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



**LO HUMANO
ES
DE NUESTRA DIFERENCIA**

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:	Q.F.B. MAURO ARRIETA SÁNCHEZ
VOCAL:	Q.F.B. MINERVA MALDONADO BERNY
SECRETARIO:	M. en C. BEATRIZ ESPINOSA FRANCO
SUPLENTE:	Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
SUPLENTE:	Q.F.B. ANGELICA PÉREZ MORA

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL ÁREA QUÍMICA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS DE CONTROL ANALÍTICO Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA Q.F.B. MINERVA MALDONADO BERNY.

DEDICATORIA:

A mis padres, Enrique Pegueros Díaz y Margarita O. Pérez Lara, por permitirme sentir siempre su apoyo y amistad en cualquier circunstancia, pero sobre todo por sentar las bases para construir mi propio camino. Por siempre mi amor y respeto para ustedes.

A mi hermano César por su interés en mi desarrollo profesional y personal. Tú sabes que tendrás siempre a alguien con quien contar cuando lo necesites.

A mi hermana Olivia que esté siempre presente.

Ai resto de la familia Pegueros y Pérez.

AGRADECIMIENTOS:

A la Q.F.B. Minerva Maldonado Berry por el tiempo dedicado y por su amistad.

Al CINVESTAV y el personal que en él labora por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A la FES ZARAGOZA por haber sido el centro donde se dieron y crecieron mis inquietudes profesionales.

A Estrella, Lety y Alex por su interés.

TABLA DE CONTENIDO.

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1.0. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
1.1. Espectrofotometría de Absorción UV-VIS	
1.1.1. Absorción de la radiación	3
1.1.2. Medida de los espectros de Absorción	4
1.1.3. Aplicaciones cuantitativas de los espectros de absorción	
A) Análisis de un componente	7
B) Espectrofotometría de derivadas	8
C) Análisis de multicomponentes (A.M.C.)	11
D) Análisis de multicomponentes por cuantificación del espectro completo (C.E.C.)	12
1.2. Validación	
1.2.1. Revalidación	16
1.2.2. Validación de métodos analíticos	17
1.3. Robustez de un método analítico.	21
1.4. Propiedades generales de los fármacos estudiados	22
2.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3.0. OBJETIVOS	33
4.0. HIPÓTESIS	34
5.0. DESARROLLO EXPERIMENTAL	35
5.1. Material	
5.2. Reactivos	
5.3. Equipo	
5.4. Procedimiento	
5.4.1. Calificación del equipo	36
5.4.2. Etapa I. Determinación de las condiciones del funcionamiento del sistema de multicomponentes	37
5.4.3. Etapa II. Validación de los métodos analíticos para las formulaciones 8, 9 y 10	53

5.4.4. Etapa III. Evaluación de la robustez de los métodos analíticos validados	54
6.0. RESULTADOS	
6.1. Evaluación de las condiciones de operación del sistema de multicomponentes	55
6.2. Resultados de la validación de los métodos analíticos para las formulaciones 8, 9 y 10	59
6.3. Evaluación de la robustez de los métodos analíticos validados	82
7.0. ANÁLISIS DE RESULTADOS	85
8.0. CONCLUSIONES	89
Anexo I. Espectros obtenidos en modo de absorbancia, primera y segunda derivada de los fármacos y mezclas de estándares estudiados.	90
Anexo II. Gráficos de linealidad del sistema y del método para las formulaciones validadas.	98
Anexo III. Cálculos estadísticos y criterios de aceptación para la validación de métodos analíticos.	106
Anexo IV. Diagnóstico de formulaciones para el análisis mediante el sistema de multicomponentes por cuantificación del espectro completo	115
9.0. BIBLIOGRAFÍA	131

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Diagrama de un espectrofotómetro. a)fuente de luz; b)selector de longitud de onda; c)caída; d)detector; e)amplificador; f)registrador. (4)
- Fig. 2.** Diagrama de un espectrofotómetro de doble haz con sistema de espejos rotatorios. a)lámpara; b)monocromador; c)caída para la muestra; d)caída para el blanco; e y e') espejos rotatorios; f y f')espejos; g)detector; h)amplificador; i)registrador. (6)
- Fig. 3.** Espectro derivado de una curva de absorción Gaussiana. (9)
- Fig. 4.** Diferentes métodos para la obtención de la señal analítica en los espectros derivados. (10)
- Fig. 5.** Comparación de dos lotes para la cuantificación de espiroclotona/furosemida en cápsulas. (82)
- Fig. 6.** Comparación de dos lotes para la cuantificación de hidroclotona/cloranfenicol/benzocaina en solución ótica. (83)
- Fig. 7.** Comparación de dos lotes para la cuantificación de sulfametoxazol/trimetoprim en tabletas. (84)

ÍNDICE DE FORMULACIONES

Formulación 1.	Ac. acetilsalicílico	325 mg
	Metocarbamol	400
Formulación 2	Dipiridamol	75 mg
	Ac. acetilsalicílico	50
Formulación 3.	Clorhidrato de amantidina	50 mg
	Clorhidrato de fenilefrina	5
	Maleato de clorfeniramina	2
	Ac. acetilsalicílico	350
Formulación 4.	Nifuroxima	4.24 mg
	Hidrocortisona	2.5
	Antipirina	50.0
	Benzocaina	50.0
Formulación 5.	Acetaminofén	300 mg
	Cafeína	25
	Clorhidrato de fenilefrina	4
	Maleato de clorfeniramina	4
Formulación 6.	Maleato de clorfeniramina	2.0 mg
	Clorh. de fenilpropranolamina	5.0
	Acetaminofén	20.0
	Cafeína	2.5
	Vehículo c.b.p.	1.0 ml
Formulación 7.	Clorh. de tiamina	3.0 mg
	Riboflavina 5-fosfato	3.0
	Nicotinamida	20.0
	Clorh. de piridoxina	4.0
	Pantenol	10.0
	Vehículo c.b.p.	1 ml
Formulación 8.	Espironolactona	50 mg
	Furosemida	20
	Excipiente c. b. p.	1 cápsula
Formulación 9.	Hidrocortisona	1.0 g
	Cloranfenicol	2.5
	Benzocaina	2.0
	Vehículo c.b.p.	100 ml
Formulación 10.	Sulfametoxazol	400 mg
	Trimetoprim	80
	Excipiente c. b. p.	1 tableta

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Parámetros a evaluar en un método indicador de control de calidad. (19)
- Tabla 2.** Intervalos de % de recobro y límites para los coeficientes de variación de los diferentes métodos analíticos. (20)
- Tabla 3.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 1. (38)
- Tabla 4.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 2. (39)
- Tabla 5.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 3. (40)
- Tabla 6.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 4. (41)
- Tabla 7.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 5. (42)
- Tabla 8.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 6. (43)
- Tabla 9.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 7. (45)
- Tabla 10.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 8. (47)
- Tabla 11.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 9. (49)
- Tabla 12.** Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 10. (51)
- Tabla 13.** Comparación de los % de recobro para fármacos con gran superposición de espectros en los tres modos espectrofotométricos de análisis. (55)
- Tabla 14.** Comparación de los % de recobro para fármacos que presentan gran diferencia de concentraciones en formulación. (56)
- Tabla 15.** Comparación de los % de recobro para fármacos que presentan gran diferencia de concentraciones y superposición de espectros. (56)

- Tabla 16.** Comparación de los % de recobro para fármacos que son cuantificables en una mezcla de estándares puros, pero no en la forma farmacéutica. (57)
- Tabla 17.** Comparación de los % de recobro para fármacos que son cuantificables en una mezcla de estándares puros y en la forma farmacéutica. (58)
- Tabla 18.** Valores obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema de medición para esprionolactona y furosemida. (59)
- Tabla 19.** Evaluación de la linealidad del sistema para esprionolactona. (59)
- Tabla 20.** ANOVA para la linealidad del sistema (esprionolactona). (60)
- Tabla 21.** Evaluación de la linealidad del sistema para furosemida. (60)
- Tabla 22.** ANOVA para la linealidad del sistema (furosemida). (60)
- Tabla 23.** Valores obtenidos en la evaluación de la exactitud del método para esprionolactona y furosemida. (61)
- Tabla 24.** Evaluación de la linealidad del método para esprionolactona. (61)
- Tabla 25.** ANOVA para la linealidad del método (esprionolactona). (62)
- Tabla 26.** Evaluación de la linealidad del método para furosemida. (62)
- Tabla 27.** ANOVA para la linealidad del método (furosemida). (62)
- Tabla 28.** Evaluación de la repetibilidad del método para esprionolactona. (63)
- Tabla 29.** ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (esprionolactona). (63)
- Tabla 30.** Evaluación de la repetibilidad del método para furosemida. (63)
- Tabla 31.** ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (furosemida). (64)
- Tabla 32.** Resumen de la validación de la formulación 8. (65)
- Tabla 33.** Valores obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema de medición para hidrocortisona, cloranfenicol y benzocaina. (66)
- Tabla 34.** Evaluación de la linealidad del sistema para hidrocortisona. (66)
- Tabla 35.** ANOVA para la linealidad del sistema (hidrocortisona). (66)
- Tabla 36.** Evaluación de la linealidad del sistema para cloranfenicol. (67)

- Tabla 37.** ANOVA para la linealidad del sistema (cloranfenicol). (67)
- Tabla 38.** Evaluación de la linealidad del sistema para benzocaína. (67)
- Tabla 39.** ANOVA para la linealidad del sistema (benzocaína). (68)
- Tabla 40.** Valores obtenidos en la evaluación de la exactitud del método para hidrocortisone, cloranfenicol y benzocaína. (68)
- Tabla 41.** Evaluación de la linealidad del método para hidrocortisone. (69)
- Tabla 42.** ANOVA para la linealidad del método (hidrocortisone). (69)
- Tabla 43.** Evaluación de la linealidad del método para cloranfenicol. (69)
- Tabla 44.** ANOVA para la linealidad del método (cloranfenicol). (70)
- Tabla 45.** Evaluación de la linealidad del método para benzocaína. (70)
- Tabla 46.** ANOVA para la linealidad del método (benzocaína). (70)
- Tabla 47.** Evaluación de la repetibilidad del método para hidrocortisone. (71)
- Tabla 48.** ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (hidrocortisone). (71)
- Tabla 49.** Evaluación de la repetibilidad del método para cloranfenicol. (71)
- Tabla 50.** ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (cloranfenicol). (72)
- Tabla 51.** Evaluación de la repetibilidad del método para benzocaína. (72)
- Tabla 52.** ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (benzocaína). (72)
- Tabla 53.** Resumen de la validación de la formulación 9. (74)
- Tabla 54.** Valores obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema de medición para sulfametoxazol y trimetoprim. (75)
- Tabla 55.** Evaluación de la linealidad del sistema para sulfametoxazol. (75)
- Tabla 56.** ANOVA para la linealidad del sistema (sulfametoxazol). (75)
- Tabla 57.** Evaluación de la linealidad del sistema para trimetoprim. (76)
- Tabla 58.** ANOVA para la linealidad del sistema (trimetoprim). (76)

- Tabla 59.** Valores obtenidos en la evaluación de la exactitud del método para sulfametoxazol y trimetoprim. (77)
- Tabla 60.** Evaluación de la linealidad del método para sulfametoxazol. (77)
- Tabla 61.** ANOVA para la linealidad del método (sulfametoxazol). (77)
- Tabla 62.** Evaluación de la linealidad del método para trimetoprim. (78)
- Tabla 63.** ANOVA para la linealidad del método (trimetoprim). (78)
- Tabla 64.** Evaluación de la repetibilidad del método para sulfametoxazol. (78)
- Tabla 65.** ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (sulfametoxazol). (79)
- Tabla 66.** Evaluación de la repetibilidad del método para trimetoprim. (79)
- Tabla 67.** ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (trimetoprim). (79)
- Tabla 68.** Resumen de la validación de la formulación 10. (81).

INDICE DE DIAGRAMAS

- Diagrama 1.** Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de una solución pediátrica, para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 6). (44)
- Diagrama 2.** Procedimiento de preparación de una solución problema, a partir de una solución inyectable, para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 7). (46)
- Diagrama 3.** Procedimiento de preparación de una solución problema, a partir de una mezcla homogénea del contenido de 20 cápsulas para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 8). (48)
- Diagrama 4.** Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de la mezcla homogénea de solución ótica, para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 9). (50)
- Diagrama 5.** Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de la mezcla homogénea del polvo proveniente de 20 tabletas, para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 10). (52).

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos métodos y técnicas analíticas, así como la evaluación o modificación de éstas para la cuantificación de polifármacos es de gran importancia en el área farmacéutica con el fin de obtener un buen control de calidad de los productos. Durante mucho tiempo, la espectrofotometría UV-VIS ha sido una técnica de amplio uso en el análisis cuantitativo debido a que es sencilla, rápida y económica, por lo que se han hecho innovaciones en los equipos que mejoran o amplían sus capacidades y en los últimos años se ha empleado esta técnica para el análisis cuantitativo de sistemas multicomponentes, ya que el manejo de las transformaciones matriciales en computadora ha aumentado y muchos espectrofotómetros han sido acoplados a ellas pudiendo ejecutar estas transformaciones casi de forma instantánea.

El análisis de multicomponentes por cuantificación del espectro completo (CEC), es un sistema novedoso en espectrofotometría UV-VIS que podría determinar con exactitud y precisión la concentración de los componentes de una mezcla los cuales exhiben severa superposición espectral o bien que tienen comportamiento espectral similar, ya que el sistema por CEC emplea todos los datos del espectro a todas las longitudes de onda de todos los componentes al mismo tiempo y mediante el método de regresión de mínimos cuadrados calcula la concentración de cada uno de los compuestos de interés presentes en la mezcla.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el sistema de multicomponentes por CEC para el análisis cuantitativo de productos farmacéuticos polifármacos. La evaluación comprendió tres etapas; en la primera se evaluaron y establecieron las condiciones bajo las cuales el sistema funcionó adecuadamente (selección del número de soluciones de referencia para la calibración, determinación del intervalo de concentraciones e intervalo de longitud de onda para el análisis, selección del modo espectrofotométrico para la cuantificación), mediante el estudio de 10 formulaciones las cuales tenían de 2 a 4 fármacos y además presentaban alguna de las siguientes características: gran superposición de espectros, gran diferencia de concentración entre componentes, ambas características o ninguna de ellas.

En la segunda etapa se validaron los métodos analíticos desarrollados para tres de las formulaciones donde el sistema funcionó de manera óptima; y en la tercera etapa se evaluó la robustez de los métodos analíticos validados mediante el análisis de dos lotes diferentes para cada formulación.

Con los resultados obtenidos se concluyó que el empleo del sistema de multicomponentes por CEC se ve limitado a mezclas donde todos los componentes contribuyen a la absorción total, no existe gran diferencia en el orden de magnitud de sus concentraciones, y no presentan interferencias que impidan la cuantificación de cada uno de ellos; además el sistema es altamente eficiente si las mezclas de fármacos se evalúan con las soluciones de referencia convenientes y en un intervalo de longitud de onda bien definido en el modo de absorción. Al evaluar la robustez de los métodos validados, se observó que éstos son capaces de establecer las diferencias que existen entre lotes elaborados bajo condiciones de excipientes diferentes.

Por otra parte, la utilidad del sistema en el análisis de productos farmacéuticos polifármacos se encuentra restringido a un 33% de las formulaciones presentes en el mercado nacional, en cuyo caso el sistema resultaría eficiente.

1.0. FUNDAMENTO TEÓRICO.

1.1. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE

Los átomos y moléculas son capaces de absorber energía (la cual se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética) dependiendo de la estructura de la sustancia. El tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con su estructura, así como con el número de moléculas que interactúan con la radiación. El estudio de estas dependencias se conoce como ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN. Esta es una de las técnicas analíticas que probablemente permanecerá como un instrumento útil debido a que es rápida, sencilla, sensible y económica.

1.1.1. ABSORCIÓN DE LA RADIACIÓN

La espectrofotometría de absorción, consiste en la medida de absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática.

La radiación electromagnética es la energía propagada en forma de onda que viaja a la velocidad de la luz y que presenta propiedades de partículas llamadas fotones.

La longitud de onda (λ) es la distancia lineal entre dos puntos consecutivos de la onda, y sus dimensiones se expresan generalmente en nanómetros ($\text{nm} = 10^{-9}\text{m} = 10^{-7}\text{cm}$). Asociada a la longitud de onda se encuentra la frecuencia (ν), que es el número de ondas que pasan por un punto dado en un tiempo determinado.

La λ y la ν están relacionadas con la energía del fotón (E), por la constante de Planck ($h = 6.62 \times 10^{-34}\text{ J/seg}$) y con la velocidad de la luz ($c = 3 \times 10^8\text{ m/s}$) de la siguiente manera:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1)$$

De acuerdo a la ec.(1), la energía de radiación es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda. De esta forma, a mayor longitud de onda, la energía por fotón disminuye. (1,2)

Las técnicas de absorción UV-VIS incluyen métodos analíticos basados en la medición de la absorción de la luz por las sustancias en la región del espectro electromagnético de longitud de onda de 190 a 900 nm. La región de 190 a 360 nm es la correspondiente a la radiación UV, y de 360 a 900 nm a la visible.

La absorción en la región UV-VIS implica transiciones electrónicas dentro de las moléculas. Los estados basales de energía de una molécula orgánica pueden estar en orbitales σ , π o n (no enlace). Sus estados excitados correspondientes son σ^* , π^* y n^* respectivamente y las transiciones que son responsables de la absorción UV-VIS son $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$. La parte de la molécula que es responsable de la transición es llamado "cromóforo".

Las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ son generalmente de energía muy alta y ellas son observadas a longitud. de onda < 190 nm. Los compuestos conteniendo grupos funcionales halógeno, éter, tioéter, amino, hidroxilo y otros grupos con pares de electrones no compartidos presentarán transiciones $n \rightarrow \sigma^*$; la absorción debida a éstas, es débil y en la mayoría de los casos ocurre a longitudes de onda muy cortos para ser medidas.

Las transiciones a orbitales π^* están asociadas con centros insaturados en la molécula, tales como grupos alqueno, carbonilo, imino y azo. Las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ son de menor energía que las $n \rightarrow \sigma^*$ y se dan a longitudes de onda muy grandes. La energía de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ está entre las dos anteriores. (3)

Para que las moléculas absorban radiación, primero deben interactuar con ella; este efecto puede ocurrir en aproximadamente 10^{-16} seg. que es el período de oscilación de la onda electromagnética. La absorción de energía terminará cuando la molécula alcance cualquiera de los niveles de energía en su estado excitado. Una molécula excitada puede regresar a su estado basal, ya sea perdiendo energía en forma de calor o reemitiendo la radiación electromagnética dentro de un período de 10^{12} seg. La más favorecida será aquella que minimice la duración del estado excitado. (1)

1.1.2 MEDIDA DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Los instrumentos para la medida de absorción en la región UV-VIS consisten de seis componentes básicos que aparecen en la fig. 1:

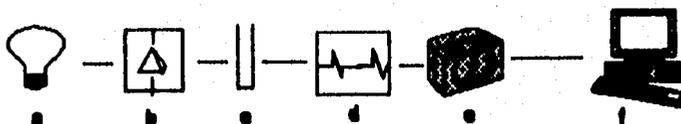


Fig. 1. Diagrama de un espectrofotómetro. a)fuente de luz; b)selector de longitud de onda; c) celda; d) detector; e) amplificador; f)registrador.

A continuación se presenta una breve descripción de las partes básicas de un espectrofotómetro:

a) *Fuente de luz*: las fuentes de radiación deben cumplir con dos características básicas:

- debe emitir una señal detectable en toda la región de estudio
- la intensidad de la luz emitida debe ser uniforme

Estas características tienen por objeto regular las señales del detector a través de la región de estudio. Para la región UV se emplean lámparas de descarga de hidrógeno o deuterio y para la VISIBLE, lámparas con filamento de tungsteno.

b) *Selector de longitud de onda*: los selectores de longitud de onda tienen por objeto descomponer la radiación policromática en sus componentes, permitiendo así el paso de un haz monocromado cuya longitud de onda corresponda a la región en estudio. Estos pueden ser:

Filtros: son cristales dieléctricos transparentes (fluoruro de calcio o magnesio) prensados entre dos películas metálicas semitransparentes que se encuentran adheridas a dos placas de vidrio. Estos materiales permiten solo la transmisión de regiones de longitud de onda limitada, absorbiendo la mayor parte de la radiación de otras longitudes de onda.

monocromadores: el monocromador desdobra la radiación policromática en las longitudes de onda que la forman y las separa en bandas muy angostas; en general consiste de: (1) rendija de entrada por la que penetra la radiación de la fuente, (2) un colimador (lente o espejo) que hace paralela la radiación procedente de la rendija de entrada, (3) un dispersor (prisma o rejilla) que desdobra la radiación en las diferentes longitudes de onda que la componen, (4) lente de enfoque o espejo, y (5) una rendija de salida para aislar la banda espectral deseada, bloqueando toda la radiación dispersada excepto la del intervalo deseado. Todos estos componentes están montados dentro de una caja hermética a la luz y por lo general, el elemento dispersante del monocromador es un prisma, que para la luz VISIBLE el vidrio es un buen material, mientras que para la luz UV, se emplea un prisma de cuarzo o sílice fundido.

c) *Celdas*: estas son de diferentes materiales transparentes a la luz según la región del espectro en estudio. Para la región UV, las celdas son de cuarzo o sílice fundido, mientras que para la región VISIBLE se pueden emplear las anteriores o de vidrio o plástico.

d) *Detector*: la función del un detector es convertir la radiación electromagnética en un flujo de electrones y posteriormente en una corriente o voltaje en el circuito de lectura. Los detectores que generan corriente eléctrica se conocen como detectores fotoeléctricos y pueden ser Fototubos y Tubos Fotomultiplicadores.

e) *Amplificadores*: su función es transformar la señal electrónica generada por el detector, en señales que puedan ser interpretadas.

f) *Registrador*: son instrumentos que registran automáticamente el espectro de Absorbancia o Transmitancia, trazando la curva Absorbancia/Transmitancia Vs Longitud de onda en papel. (1)

Los instrumentos en términos de su construcción, pueden ser de dos tipos:

- *Instrumentos con un haz sencillo*: en estos instrumentos el haz proveniente de la fuente pasa al monocromador; las bandas de luz monocromada a diferentes longitudes de onda se enfocan al diafragma de salida y pasan al detector a través de la celda; el aparato se ajusta a 0 y 100 % de Transmitancia empleando un blanco (disolvente puro) de la muestra a analizar. La principal ventaja de este instrumento es su simplicidad; su principal desventaja es que debe calibrarse a cada longitud de onda.

- *Instrumentos con doble haz*: éstos tienen un dispositivo que divide el haz en dos antes de entrar a la muestra; una parte entra a la celda con la muestra y otra a la celda de referencia (blanco). Los dos rayos se comparan continuamente varias veces en un segundo, por lo tanto, las fluctuaciones provenientes de la fuente, detector y amplificador se compensan con la señal entre la referencia y la muestra (1,3). La figura 2 muestra un diagrama de un espectrofotómetro de doble haz.

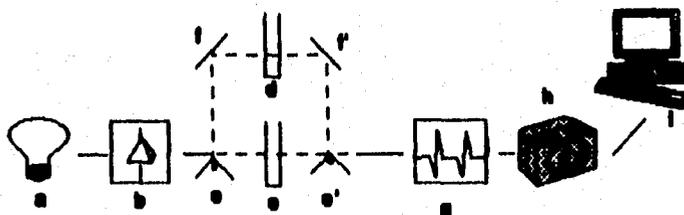


Fig. 2. Diagrama de un espectrofotómetro de doble haz con sistema de espejos rotatorios. a) lámpara; b) monocromador; c) celda para la muestra; d) celda para el blanco; e y e') espejos rotatorios; f y f') espejos; g) detector h) amplificador; y) registrador.

1.1.3 APLICACIONES CUANTITATIVAS DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN

El análisis espectroscópico cuantitativo se basa en la relación entre la cantidad de luz absorbida y la cantidad de sustancia absorbente. Los parámetros espectroscópicos que se miden son la Transmitancia (T) y la Absorbancia (A).

$$T = I_0/I \qquad A = \log(1/T) \qquad (2)$$

I_0 = intensidad de la luz incidente

I = intensidad de la luz después de pasar a través del espesor de la solución

La dependencia de la intensidad de la luz incidente respecto a la concentración de especie absorbente, puede encontrarse de manera paralela, si la longitud de onda y la distancia que atraviesa el rayo en la muestra permanecen constantes. Esta dependencia se conoce como la LEY DE BEER que establece:

"La absorción de una solución es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente" (2) y se expresa con la sig. ecuación:

$$A = abc \qquad (3)$$

A = absorbancia

a = absortividad

b = longitud del paso de luz interno de la celda

c = concentración de la muestra

La absortividad, a, depende de la temperatura del disolvente, de la estructura molecular y de la longitud de onda de la radiación; sus unidades se determinan a partir de b y c. Cuando b está dado en cm y c en g/l, a se expresa en l/g cm. Si c es una concentración molar, la absortividad recibe el nombre de absortividad molar, la cual se representa por ϵ y sus unidades son l/mol cm. (2)

A. ANÁLISIS DE UN COMPONENTE.

La concentración de una sustancia presente en una muestra, puede ser fácilmente calculada a partir de la gráfica de la ley de Beer; dicha gráfica se obtiene a partir de una serie de soluciones de la sustancia en cuestión, a las cuales se les mide su absorbancia a la misma longitud de onda, temperatura y condiciones de disolución. Se representa la absorbancia de cada solución en función de su concentración y se obtendrá por lo general una línea recta que pasa

por el origen (lo que implica que se cumple con dicha ley en el rango de concentraciones investigada).

Una vez que se tiene la gráfica, se prepara una solución de la muestra en el mismo disolvente utilizado para las soluciones conocidas; la concentración estimada para esta solución deberá estar dentro del intervalo de concentración usadas en el estudio de la ley de Beer. Se mide la absorbancia de la muestra desconocida a la longitud de onda establecida y se lee su concentración a partir de la gráfica. Para que esta técnica sea aplicable es necesario que no esté presente ninguna sustancia interferente (es decir, una sustancia que sea capaz de absorber la luz a la longitud de onda de estudio), en la muestra. En una versión simplificada de este método, se emplea una medida "unipuntual" de la solución de la muestra y una solución patrón del mismo compuesto cuya concentración se conoce. Se efectúa el mismo procedimiento con el patrón y con la muestra y se realiza el sig. cálculo:

$$C_x = C_r A_x / A_r \quad (4)$$

donde:

C_x = concentración de la muestra
 C_r = concentración de la solución patrón
 A_x = absorbancia de la muestra
 A_r = absorbancia de la solución patrón

La longitud de onda seleccionada para el estudio es usualmente la máxima de absorción. Los espectros de absorción de una muestra dependen de las condiciones del medio, ya que la longitud máxima puede cambiar al modificar el disolvente debido a que las interacciones soluto - solvente serán diferentes. También se advierten otros efectos notables en los espectros de ácidos y bases cuando se varía el pH del medio. (2)

B. ESPECTROFOTOMETRIA DE DERIVADAS.

Bajo el nombre de espectro derivado se entiende la representación gráfica en un intervalo determinado de longitud de onda, el cociente diferencial $dA/d\lambda$ para la primera derivada; $d^2A/d\lambda^2$ para la segunda y así sucesivamente para las derivadas de orden superior. La función $dA/d\lambda$ pasa por un máximo y un mínimo en los puntos de inflexión y vale cero en el máximo.

La distancia vertical entre el máximo y el mínimo de la derivada se denomina "amplitud" y constituye el parámetro analítico que suele utilizarse para relacionarlo de forma lineal con la concentración (4) (Figura 3)

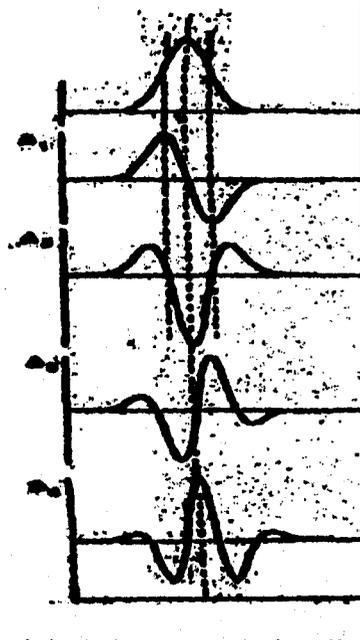


Fig. 3. Espectro derivado de una curva de absorción Gaussiana.

La utilización de espectros derivados tiene gran utilidad para fines cuantitativos. Para una sustancia absorbente y para una longitud de onda dada, la ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración (ec. 3); en cambio si se fija la concentración en un valor constante, la absorbancia A de la disolución es función de la longitud de onda utilizada, puesto que $\epsilon = f(\lambda)$.

Si se deriva la ecuación (2) con respecto a la longitud de onda, se obtiene:

$$dA/d\lambda = bC \, d\epsilon/d\lambda \quad (5)$$

Ahora bien, para una longitud de onda dada, el término $d\epsilon/d\lambda$ es una constante característica del sistema; por lo que la expresión puede ser escrita como:

$$dA/d\lambda = kC \quad (6)$$

es decir, para una longitud de onda dada, la pendiente del espectro de absorción es función lineal de la concentración.

Los procedimientos más usados para obtener el parámetro analítico son:

a) *Método de la tangente*: se traza la tangente entre dos máximos vecinos y se mide en la dirección paralela al eje de ordenadas, la distancia entre la tangente y el mínimo situado entre los dos máximos.

b) *Medida de la separación entre picos*: se mide la separación entre un máximo y un mínimo vecinos que sean característicos de la sustancia que se determina.

c) *Medida de la altura hasta la línea base*: se mide la separación entre el máximo y la línea de cero. (Figura 4)

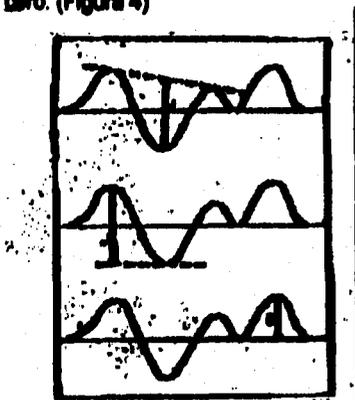


Figura 4. Diferentes métodos para la obtención de la señal analítica en los espectros derivados.

Los factores que afectan el cálculo de derivadas pueden ser de dos tipos:

- *Distorsión*: una curva derivada calculada con incremento de longitud de onda finito, se distorsiona debido a una disminución de la señal derivada y a una disminución en la resolución.

- *Relación señal/ruido*: el ruido aumentará conforme lo haga el orden de la derivada, por lo tanto la relación señal/ruido (S/N) disminuye al aumentar el orden de la derivada. El ruido se puede expresar como la desviación estándar de la absorbancia del blanco, σ .

Las ventajas de la espectroscopia de derivadas son: 1) medida exacta de la longitud de onda del máximo de absorción, 2) mejor resolución de espectros, 3) determinaciones cuantitativas en sistemas de dos o mas componentes. (4,5)

C. ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES (A. M. C.)

El análisis espectrofotométrico de varios componentes está basado en las medidas de absorbancia a longitudes de onda seleccionadas de acuerdo a la ley de Beer expresada en la ecuación (3). Asumiendo que se emplea la misma celda tanto para los estándares como para las muestras, la Absorbancia se puede escribir como:

$$A = k c \quad (7)$$

donde k es una constante de proporcionalidad.

Para un sistema de multicomponentes, la aplicación de la aditividad de la ley de Beer a una mezcla de componentes diferentes se puede expresar a las distintas longitudes de onda de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} A_1 &= k_{11}c_1 + k_{12}c_2 + \dots + k_{1j}c_j \\ A_2 &= k_{21}c_1 + k_{22}c_2 + \dots + k_{2j}c_j \end{aligned}$$

$$A_i = k_{i1}c_1 + k_{i2}c_2 + \dots + k_{ij}c_j \quad (8)$$

donde:

A_i = absorbancia correspondiente a la i -ésima longitud de onda, y va desde $1 \rightarrow n$
 c_j = es la concentración del componente j -ésimo desde $1 \rightarrow n$, y
 k_{ij} = es la constante de proporcionalidad a la i -ésima longitud de onda del componente j -ésimo.

La ecuación de arriba expresada en forma de matriz es:

$$\begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ A_j \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} k_{11} & k_{12} & \dots & k_{1j} \\ k_{21} & k_{22} & \dots & k_{2j} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ k_{i1} & k_{i2} & \dots & k_{ij} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_j \end{bmatrix} \quad (9)$$

ó

$$A = K C \quad (10)$$

Si las constantes de proporcionalidad son conocidas, la solución para las concentraciones buscadas es obtenida, en el caso de sistemas exactamente determinados (el número de longitud de onda i es igual a el número de componentes j - matriz cuadrada -), por inversión de la ecuación (6):

$$C = K^{-1} A \quad (11)$$

Generalmente, las constantes de proporcionalidad no son conocidas y tienen que ser determinadas mediante una técnica de calibración; ésta puede llevarse a cabo corriendo el espectro de los componentes puros a las longitudes.

de onda de estudio y relacionando la concentración del componente y su Absorbancia. (8,7)

Una condición del AMC es que requiere seleccionar longitudes de onda en donde no exista superposición de espectros entre componentes, es decir, donde la absorptividad molar para cada uno de los componentes sea muy diferente. Esta condición hace al método crítico, ya que la selección de las longitudes de onda implica que algunas son estadísticamente mejores que otras.

Por otra parte el AMC asume que cada componente en una mezcla se comporta exactamente igual como si fuera una muestra pura (no toma en cuenta las interacciones entre moléculas), dando como resultado calibraciones no óptimas o cálculo de concentraciones inexactas de algunos componentes. (8,9)

D. ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES POR CUANTIFICACIÓN DEL ESPECTRO COMPLETO (C.E.C.)

El sistema de multicomponentes por CEC a diferencia del análisis del AMC tradicional, emplea todos los datos del espectro, a todas las longitudes de onda para todos los componentes al mismo tiempo y de esta forma efectúa la calibración del sistema. Mediante el sistema por CEC, es posible determinar la concentración de los componentes presentes en una mezcla, los cuales exhiben gran superposición espectral o comportamiento espectral similar.

Es esencial que todos los estándares para el paso de calibración, sean mezclas de todos los componentes para compensar los efectos en la absorbancia debidos a las interacciones entre compuestos. Por otra parte, las concentraciones de todos los componentes deben ser variadas dentro de cada estándar para evitar información redundante. El rango de concentración de cada componente debe ser sumamente cerrado al rango esperado en las muestras para asegurar óptima exactitud. (9)

Tomando en cuenta lo anterior, la ecuación (9) se extiende a la siguiente forma:

$$\begin{bmatrix} A_1^1, A_1^2, \dots, A_1^n \\ A_2^1, A_2^2, \dots, A_2^n \\ \vdots \\ A_j^1, A_j^2, \dots, A_j^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} k_{11} & k_{12} & \dots & k_{1n} \\ k_{21} & k_{22} & \dots & k_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ k_{j1} & k_{j2} & \dots & k_{jn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} c_1^1, c_1^2, \dots, c_1^n \\ c_2^1, c_2^2, \dots, c_2^n \\ \vdots \\ c_j^1, c_j^2, \dots, c_j^n \end{bmatrix} \quad (12)$$

donde las matrices A y C han sido extendidas para incluir una columna de A's y una columna de c's respectivamente para cada mezcla estándar; la matriz K es idéntica a la ecuación (8). En este caso $m > n$, es decir, el número de mezcla estándar debe ser igual o mayor al número de componentes. Simplificando:

$$\bar{A} = K \bar{C} \quad (13)$$

donde A y C son las matrices extendidas de A y C respectivamente. Se puede resolver esta ecuación para encontrar el valor de K, sin embargo se debe hacer notar que A y C no son necesariamente matrices cuadradas, ya que en muchos casos, las mezclas de estándares (m) son mayores que los componentes empleados (j) complicando la solución de la ecuación, debido a que existe un número infinito de soluciones para K. Este problema puede resolverse multiplicando ambos lados de la ecuación (13) por la matriz traspuesta de C

$$\bar{A} \bar{C}^t = K \bar{C} \bar{C}^t \quad (14)$$

y ambos lados por la inversa de la matriz cuadrada ($\bar{C} \bar{C}^t$) que da como resultado

$$\bar{A} \bar{C}^t (\bar{C} \bar{C}^t)^{-1} = K \bar{C} \bar{C}^t (\bar{C} \bar{C}^t)^{-1} \quad (15)$$

despejando K:

$$\begin{aligned} K \bar{C} \bar{C}^t &= \bar{A} \bar{C}^t \{ (\bar{C} \bar{C}^t)^{-1} / (\bar{C} \bar{C}^t)^{-1} \} \\ K \bar{C} \bar{C}^t &= \bar{A} \bar{C}^t \cdot 1 \\ K &= \bar{A} \bar{C}^t (\bar{C} \bar{C}^t)^{-1} \end{aligned} \quad (16)$$

Esta ecuación representa el ajuste de mínimos cuadrados de K y minimiza la suma de los cuadrados de las diferencias entre las absorbancias calculadas y observadas. La inversa de K puede ser calculada y usada en la ecuación (11) para determinar las concentraciones de los compuestos de interés a partir de las absorbancias medidas.

El método descrito arriba requiere la inversión de dos matrices; la inversa de ($\bar{C} \bar{C}^t$) para obtener K y la inversa de K para obtener las concentraciones en la muestra a partir de las absorbancias medidas empleando la ecuación (11). Ambas inversiones pueden presentar error de cálculo, por lo que un intercepto diferente a cero se incluye en el sistema multicomponente de tal forma que en la ecuación (12), la matriz K aumenta en una columna de K₀ y la matriz C en una fila de 1's:

$$\begin{bmatrix} A_1' & A_1^* \dots & A_1^m \\ A_2' & A_2^* \dots & A_2^m \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ A_j' & A_j^* \dots & A_j^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} k_{11} & k_{12} \dots & k_{1j} & k_{10} \\ k_{21} & k_{22} \dots & k_{2j} & k_{20} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ k_{j1} & k_{j2} \dots & k_{jj} & k_{j0} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} c_1' & c_1^* \dots & c_1^m \\ c_2' & c_2^* \dots & c_2^m \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ c_j' & c_j^* \dots & c_j^m \\ 1 & 1 \dots & 1 \end{bmatrix} \quad (17)$$

Si las concentraciones para los componentes en las mezclas m son expresadas en términos convenientes tales como fracciones molares o %, la última fila de la matriz C (fila de 1's) es igual a la suma de las otras filas. Por consiguiente, la matriz C es singular (si C es cuadrada) o (C C') es singular (si C es no cuadrada) y la inversa es indeterminada, por lo que la ecuación (11) se tiene que escribir como

$$C = (K'K)^{-1} K' A \quad (18)$$

Esta ecuación es similar a un análisis de regresión de mínimos cuadrados de los elementos de la matriz K como las variables independientes (8,10,11).

El procedimiento anterior es la base para los análisis de Regresión del Componente Principal (Principal Component Regression -PCR-) y regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares -PLS-). El PCR únicamente encuentra representación abstracta para los componentes en la mezcla espectral; el PLS encuentra representación para los componentes considerando tanto la mezcla espectral y las concentraciones de forma simultánea⁽⁴⁾

Ambos métodos pueden responder de componentes conocidos en la mezcla de estándares y también de las no linealidades, impurezas, efectos matriciales e interacciones. (14) Una vez más es importante señalar que el número de estándares debe ser igual o mayor al número de componentes para seguir la regla algebraica donde n ecuaciones independientes son requeridas para encontrar una solución única para m concentraciones desconocidas. (9,14)

La utilidad de un método espectrofotométrico por análisis de multicomponentes está determinado por su selectividad y por los errores inherentes en la calibración. Si se desea obtener precisión y exactitud con respecto a los valores teóricos esperados para cada componente en una mezcla problema, la preparación de las mezclas de estándares (donde se debe establecer el intervalo de concentraciones a estudiar y la variación de concentración de cada componente en cada estándar), así como la presencia de

⁽⁴⁾ Los métodos son explicados con detalle en los trabajos citados 10-13 y no serán discutidos aquí, ya que dentro de los objetivos del presente trabajo no está el de conocer el funcionamiento del programa matemático del software

puntos importantes en el diseño del método.

En muchos análisis es difícil eliminar compuestos que absorben la radiación UV-VIS y son considerados como interferencias. Obviamente pequeños cambios significativos en la composición de una mezcla dada producen cambios en el espectro, por lo tanto, cualquier contribución a la absorbancia de la mezcla original puede dar origen a la obtención de valores erróneos en la cuantificación de cada componente. La mejor manera de tratar con una interferencia es incorporarla dentro de la calibración del sistema de tal forma que su contribución no afecte el cálculo de concentraciones. (14)

Los siguientes puntos son los requisitos que deben cumplir los compuestos para ser analizados mediante el sistema de multicomponentes por cuantificación del espectro completo (Software PECSS LAMBA-2 de Perkin Elmer) (15)

- El sistema es capaz de cuantificar con precisión y exactitud de 2 a 5 compuestos en solución; al aumentar el número de compuestos en una matriz, la precisión y exactitud en la cuantificación de uno o varios de ellos se verá disminuida debido al error estadístico inherente al software.
- Cada componente debe cumplir con la ley de Lambert-Beer en cada longitud de onda medida
- Las contribuciones de todos los componentes en la mezcla a la absorbancia total deben ser aditivas.
- Todos los componentes de la mezcla que absorben la radiación UV-VIS deben ser conocidos (no deben estar presentes impurezas o productos de degradación), de otra forma la absorbancia de un componente no identificado influirá en los resultados de forma impredecible.
- Para el caso de calibración de una mezcla de multicomponentes, el número de espectros de referencia suministrados al sistema debe ser al menos igual al número de componentes a analizar.
- Es esencial que todos los estándares sean mezcla de todos los componentes con la finalidad de controlar las no linealidades debidas a las interacciones moleculares entre los componentes.

1.2. VALIDACIÓN

El objetivo de la validación, es proporcionar los lineamientos básicos para establecer un programa, destinado a obtener productos que cumplan con las especificaciones y atributos de calidad preestablecidos. El propósito de la validación es asegurar la elaboración de productos de alta calidad que cumplan con las características indicadas en sus etiquetas, que estén en conformidad con todos los estándares y especificaciones establecidas por la compañía y que cumplan con todos los requerimientos legales de los lugares donde se fabriquen y/o se comercialicen. La validación puede ser de tres tipos diferentes:

a) *Prospectiva.* Establecer evidencia documentada de que un determinado sistema hace lo que tiene el propósito de hacer, basado sobre un protocolo previamente elaborado.

b) *Retrospectiva.* Establecer evidencia documentada de que un determinado sistema hace lo que tiene el propósito de hacer, basado en la revisión y análisis de su información histórica.

c) *Concurrente.* Establecer evidencia documentada de que un determinado sistema hace lo que tiene el propósito de hacer, basado en la información durante la actual implementación del proceso. (16)

1.2.1. REVALIDACIÓN.

Una vez que el sistema ha sido validado, se considera que está bajo control y mientras no cambien ni las condiciones, ni los parámetros el sistema continúa controlado.

Actualmente existen sistemas formales de control de los cambios que se presentan en un sistema ya validado, en el cual representantes calificados de cada una de las disciplinas involucradas, revisan los cambios actuales o los propuestos que pudieran afectar al sistema y si fuera necesario, tomar una acción correctiva para asegurar que el sistema permanece en su estado validado de control.

La revalidación, es la repetición del proceso de validación o de una parte específica de éste. En algunos casos, las compañías encuentran apropiado revalidar periódicamente ciertos sistemas aún cuando no se crea que han ocurrido cambios. Es conveniente tener la certificación de la revalidación, ya que es un testimonio documentado por autoridades calificadas de que la calificación de un sistema, calibración, validación, o la revalidación se han llevado a cabo adecuadamente y los resultados obtenidos son aceptables. (17,18).

1.2.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

La calidad de un método analítico tiene que ser caracterizada, monitoreada, evaluada y validada. La naturaleza de los métodos analíticos puede ser física, química, microbiológica, biológica o una combinación de estos tipos. La calidad del análisis es construida durante su etapa de diseño, validada en su etapa de desarrollo y confirmada en su etapa de utilización.(19)

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.(20)

La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos. El factor más importante durante la validación de cualquier método analítico, es siempre el criterio del analista, el cual es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados, con el o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, sustancias relacionadas, etc. (18)

Durante la validación se trabaja inicialmente con el principio activo para determinar si el método lo detecta adecuadamente, enseguida se cuantifica el principio activo en placebo adicionados, y finalmente se analiza el producto terminado en donde se evalúa si el procedimiento de manufactura afecta la cuantificación del principio activo. El criterio de aceptación dependerá de la complejidad del método analítico.

La validación se enfoca a conocer el error de los métodos analíticos y si ese error es menor que el establecido, la técnica se considera validada y adecuada. Los resultados parciales o finales de la validación pueden dar como conclusión que:

- a) El método es confiable y por consiguiente se considera validado.
- b) Requiere modificaciones y una vez llevadas a cabo, iniciar o completar la validación.
- c) El método no es confiable para cuantificar a la sustancia problema, por lo tanto es necesario desarrollar una nueva técnica e iniciar la validación. (21)

A. DEFINICIONES DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS.

Linealidad: la linealidad de un sistema o de un método analítico, es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos que pueden obtenerse directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo: el intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

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

Precisión: la precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una muestra homogénea del producto. Se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a. **Repetibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

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

Límite de detección: es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación: es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad: es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia: la tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, condiciones ambientales, etc.

Estabilidad de la muestra: es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. (20,22)

B. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO INDICADOR DE CONTROL DE CALIDAD (20)

Parámetro	Método nuevo	Revalidación del método	
		con cambio	sin cambio
Linealidad y precisión del sistema	X	X	X
Límite de detección			
Límite de cuantificación			
Exactitud y repetibilidad al 100 %	X	X	X
Linealidad del método	X	X	X
Precisión (reproducibilidad)	X	X	
Especificidad (control de calidad)	X	X	X
Especificidad (estabilidad)			
Tolerancia del sistema		X	
Estabilidad de la muestra analítica	X	X	X

Tabla 1. Parámetros a evaluar en un método indicador de control de calidad.

C. DETERMINACIONES DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA MÉTODO INDICADOR DE CONTROL DE CALIDAD.

Linealidad del Sistema: se determina construyendo una curva de calibración, utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 % (20).

Criterio de aceptación:

$$\begin{aligned}
 CV &< 1.5 \% \\
 r &> 0.99 \\
 r^2 &> 0.98 \\
 b &= 0
 \end{aligned}$$

Precisión del Sistema: se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema (20).

Criterio de aceptación:

$$CV < 1.5 \%$$

Linealidad del método: se determina a partir de placebo adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado. Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 %. La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación (20).

Criterio de aceptación:

Cantidad adicionada vs. cantidad recuperada:

$$m = 1$$

$$b = 0$$

$$r > 0.99$$

$$r^2 > 0.98$$

El porcentaje recuperado (R) y el CV deben estar de acuerdo con la sig. tabla:

Método	R	C.V.
Cromatográficos	98 - 102 %	< 2 %
Volumétricos	98 - 102 %	< 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103 %	< 3 %
Microbiológicos	95 - 105 %	< 5 %

Tabla 2. Intervalos del % de recobro y límites para los coeficientes de variación de los diferentes métodos analíticos.

Exactitud al 100 %: se determina de cuando menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, utilizando el método propuesto haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista (20).

Criterio de aceptación:

El R y el CV deberán estar de acuerdo a la tabla 2.

Precisión (reproducibilidad): se determina a partir de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado (20).

Criterio de aceptación:

El CV debe cumplir con lo siguiente:

Método	CV
Cromatográfico	< 2 %
Químico y espectrofotométrico	< 3 %
Microbiológico	< 5 %

Especificidad para métodos de control de calidad: con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar la(s) repuesta(s) del(los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes (20,22).

Criterio de aceptación:

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

Estabilidad de la muestra analítica: se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. La determinación debe ser efectuada por el mismo analista (18,20).

Criterio de aceptación:

La muestra es estable, si el IC para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes (20,22):

Cromatográficos	± 2 %
Volumétricos	± 2 %
Químicos y espectrofotométricos	± 3 %
Microbiológicos	± 5 %

1.3. ROBUSTEZ DE UN MÉTODO ANALÍTICO.

Se dice que un método analítico es robusto "si el proceso analítico soporta pequeños cambios en sus condiciones de operación". (23).

A menudo los resultados de un estudio colaborativo de un método analítico muestran que el método deja de ser lo bastante bueno como lo propuso el laboratorio que lo desarrolló. Esto sucede porque los experimentos que forman la base del método fueron demasiado restringidos, por ejemplo, el empleo de un

mismo equipo y lote de reactivos, las condiciones ambientales se mantuvieron constantes, el control de las condiciones de operación fue muy cerrado, etc.; por otra parte, se toma gran cuidado para no variar las partes de la rutina operacional del procedimiento en cualquiera de sus etapas. Sin embargo, debemos esperar alguna variación en el método cuando éste es aplicado en otros laboratorios ya que algunos factores como origen, edad y concentración de reactivos, grados de calentamiento, cambios de humedad y muchos otros pueden estar involucrados.

La única protección para el laboratorio iniciador en contra de un mal comportamiento, el cual es desconcertante y difícil de erradicar después de que el método ha sido puesto en uso, es introducir deliberadamente variaciones al procedimiento a medida que lo lleve a la práctica y observar que sucede. No se debe olvidar, sin embargo, que en el plan experimental no es adecuado efectuar cambios marcados, con el fin de localizar las condiciones óptimas de operación.

Cuando se evalúa la robustez de un método, esperamos que los principales efectos sean menores o preferentemente inconsistentes si el proceso analítico es realmente aceptable para el uso en general. (23)

1.4. PROPIEDADES GENERALES DE LOS FÁRMACOS ESTUDIADOS (24,25)

1.4.1. ACETAMINOFÉN (PARACETAMOL).

a) Propiedades fisicoquímicas:



4-Hidroxiacetanilida (C₈H₉NO₂)
PM 151.16

Descripción: cristales blancos o polvo blanco; p.f. 168 - 172 °C.

Solubilidad: soluble en 1:70 agua, 1:7 etanol al 10 % y 1:13 en acetona; muy ligeramente soluble en cloroformo y prácticamente insoluble en éter.

Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida a 245 nm (A₁ = 668) y en solución alcalina a 257 nm (A₁ = 715).

Constante de disociación: pK_a 9.5 (25 °C)

b) Propiedad terapéutica: analgésico, antipirético.

1.4.2. ANTIPIRINA

a) Propiedades fisicoquímicas:



1,5-Dimetil-2-fenil-4-pirazolin-3-ona
(C₁₁H₁₂N₂O) PM 188.22

Descripción: polvo blanco de sabor salado; p.f. 111 - 113 °C.

Solubilidad: soluble en 1:1 agua, 1:1 etanol, 1:1 cloroformo y 1:50 éter.

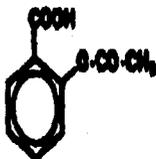
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida a 230 nm (A₁ = 590) y en solución acuosa alcalina a 242, 258 nm (A₁ = 494)

Constante de disociación: pK_a 1.5 (25 °C)

b) Propiedad terapéutica: analgésico

1.4.3. ÁCIDO ACETILSALICÍLICO (ASPIRINA).

a) Propiedades fisicoquímicas:



Ácido o-Acetilsalicílico (C₉H₈O₄)
PM 180.2

Descripción: cristales incoloros o polvo cristalino blanco; p.f. 143 °C; se descompone a ac. salicílico en exposición al aire y en soluciones alcalinas de hidróxidos y carbonatos.

Solubilidad: soluble en 1:300 agua, 1:5 etanol, 1:17 cloroformo y 1:20 éter; soluble en soluciones de citratos y acetatos y, con descomposición, en soluciones alcalinas de hidróxidos y carbonatos.

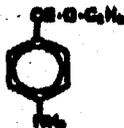
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 230 nm (A₁ = 466), 276 nm (A₁ = 68) y en solución acuosa alcalina 231 nm (A₁ = 409), 298 nm (A₁ = 190).

Constante de disociación: pK_a 3.25 (25 °C)

- Propiedad terapéutica: analgésico, antipirético, antiinflamatorio

1.4.4. BENZOCAÍNA

a) Propiedades fisicoquímicas:



4-Aminobenzoato de etilo (C₉H₁₁NO₂)
PM 165.2

Descripción: cristales incoloros o polvo cristalino blanco, p.f. 88 - 92 °C.

Solubilidad: soluble en 1:2500 agua, 1:5 etanol, 1:2 cloroformo; soluble en ácidos diluidos.

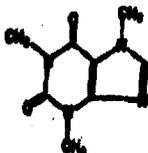
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 272 nm (A₁ = 90), en solución acuosa alcalina 265 nm (A₁ = 930) y en etanol 293 nm (A₁ = 1238).

Constante de disociación: pK_a 2.8 (25 °C)

b) Propiedad terapéutica: anestésico tópico

1.4.5. CAFEÍNA

a) Propiedades fisicoquímicas:



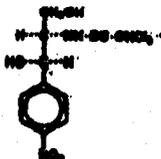
7-Metilteofilina (C₈H₁₀N₄O₂)
PM 194.19

Descripción: cristales blancos o polvo cristalino blanco, p.f. 234 - 239 °C.
Solubilidad: soluble en 1:60 agua, 1:130 etanol, 1:7 cloroformo; soluble en ácidos diluidos; descompone por efecto de soluciones fuertemente alcalinas.
Espectro ultravioleta: en solución acosa ácida 273 nm (A₁ = 504)
Constante de disociación: pK_a 14.0 (25 °C)

b) Propiedad terapéutica: estimulante del sistema nervioso central.

1.4.6. CLORANFENICOL

a) Propiedades fisicoquímicas:



C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅
PM 323.1

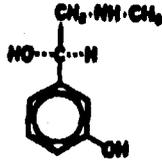
Descripción: cristales blancos o amarillo-biancuzcos, p.f. 149 - 153 °C.
Solubilidad: soluble en 1:400 agua y 1:2.5 etanol; libremente soluble en acetona y acetato de etilo; ligeramente soluble en cloroformo y éter; muy soluble en metanol, etanol y acetato de etilo.
Espectro ultravioleta: en agua 278 nm (A₁ = 298) y en metanol 271 nm (A₁ = 178).

Constante de disociación: pK_a 5.5 (25 °C)

b) Propiedad terapéutica: antibacteriano, antirickettsial

1.4.7. CLORHIDRATO DE FENLEFRINA

a) Propiedades fisicoquímicas:



1-(3-Hidroxifenil)-2-metilaminoetanol.
(C₉H₁₃NO₂ HCl) PM 203.7

Descripción: polvo cristalino blanco, p.f. 140 - 145 °C.

Solubilidad: soluble en 1:2 agua y 1:4 etanol

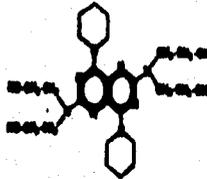
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 273 nm (A₁ = 110) y en solución acuosa alcalina 238 nm (A₂ = 534), 291 nm (A₂ = 182).

Constante de disociación: pK_a 8.9 (-OH), 10.1 (-NH-) (20 °C)

b) Propiedad terapéutica: midriático, descongestivo

1.4.8. DIPYRIDAMOL

a) Propiedades fisicoquímicas:



C₂₄H₄₀N₈O₄
PM 504.62

Descripción: polvo cristalino de color amarillo intenso que en solución posee un color amarillo fluorescente; p.f. 164 - 167 °C.

Solubilidad: insoluble en agua; muy soluble en etanol; soluble en cloroformo, metanol y sc. diluidos.

Espectro ultravioleta: en metanol ácido 230 nm, 265 nm (A₁ = 650); en solución acuosa alcalina 295 nm.

Constante de disociación: pK_a 6.4

b) Propiedad terapéutica: vaso dilatador coronario

1.4.9. ESPIRONOLACTONA

a) Propiedades fisicoquímicas:



C₂₄H₃₂O₄
PM 416.58

Descripción: polvo blanco, p.f. 198 - 207 °C.

Solubilidad: prácticamente insoluble en agua; soluble en 1:80 etanol, 1:3 cloroformo y 1:100 éter.

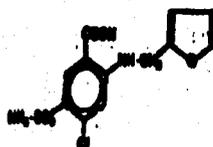
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 242 nm (A₁ = 464) y en solución alcalina 247 nm (A₁ = 405).

Constante de disociación: no reporta

b) Propiedad terapéutica: diurético

1.4.10. FUROSEMIDA

a) Propiedades fisicoquímicas:



Ácido 4-Cloro-N-furfuri-5-sulfamoyltranílico
(C₁₂H₁₁ClN₂O₅) PM 330.77

Descripción: polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo, p.f. cerca de 206 °C con descomposición.

Solubilidad: prácticamente insoluble en agua y cloroformo; soluble en 1:75 etanol, 1:15 acetona; libremente soluble en soluciones alcalinas de hidróxidos.

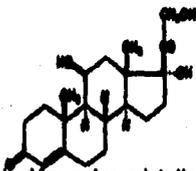
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 235 nm (A₁ = 1333), 274 nm (A₁ = 600) y en solución acuosa alcalina 271 nm (A₁ = 580).

Constante de disociación: pK_a 3.9 (20 °C).

b) Propiedad terapéutica: diurético, antihipertensivo

1.4.11. HIDROCORTISONA

a) Propiedades fisicoquímicas:



C₂₁H₃₀O₅
PM 362.5

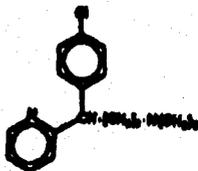
Descripción: polvo cristalino blanco, p.f. 214 °C con descomposición.
Solubilidad: prácticamente insoluble en agua y éter; soluble 1:40 etanol, 1:5 metanol; ligeramente soluble en cloroformo.

Espectro ultravioleta: en etanol 240 nm (A₁ = 435).
Constante de disociación: como succinato, pK_a 5.1.

b) Propiedad terapéutica: glucocorticosteroide, antiinflamatorio

1.4.12. MALEATO DE CLORFENIRAMINA.

a) Propiedades fisicoquímicas:



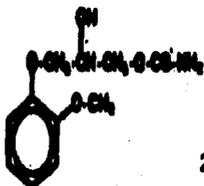
C₁₆H₁₉ClN₂
PM 154.5

Descripción: polvo cristalino blanco, p.f. 130 - 135 °C.
Solubilidad: soluble en 1:4 agua, 1:10 etanol, 1:10 cloroformo.
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 265 nm (A₁ = 302) y en solución acuosa alcalina 262 nm (A₁ = 205).
Constante de disociación: pK_a 9.1 (25 °C)

b) Propiedad terapéutica: antihistamínico

1.4.13. METOCARBAMOL

a) Propiedades fisicoquímicas:



2-Hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil carbamato
C₁₁H₁₅N₁O₅ PM 241.2

Descripción: polvo blanco, p.f. 94 °C.

Solubilidad: soluble 1:40 agua; soluble en etanol; ligeramente soluble en cloroformo; soluble en propilenglicol.

Espectro ultravioleta: metanol 275 nm (A₁ = 101).

Constante de disociación: no reporta

b) Propiedad terapéutica: relajante muscular

1.4.14. NICOTINAMIDA

a) Propiedades fisicoquímicas



Piridina-3-carboxamida (C₆H₆N₂O)
PM 122.12

Descripción: polvo cristalino blanco o cristales incoloros, p.f. 128 - 131 °C.

Solubilidad: soluble en 1:1 agua, 1:5 etanol, ligeramente soluble en cloroformo.

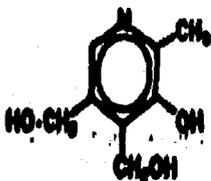
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 261 nm (A₁ = 451)

Constante de disociación: pK_a 3.3 (20 °C)

b) Propiedad terapéutica: enzima co-factor

1.4.15. CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA (VITAMINA B6)

a) Propiedades fisicoquímicas:



3-Hidroxi-4,5-bis(hidroxiometil)-2-metilpiridina.
(C8H12ClNO3) PM 205.64

Descripción: polvo cristalino blanco o cristales, p.f. 202 - 206 °C con descomposición.

Solubilidad: soluble en 1:5 agua, 1:115 etanol, prácticamente insoluble en cloroformo. Estable a la luz y aire.

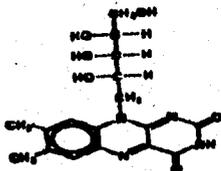
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 290 nm ($A_1 = 523$), en buffer de fosfatos pH 6.88 254 nm ($A_1 = 219$) y 324 nm ($A_1 = 426$).

Constante de disociación: pK_a 5.0 (-N=), 9.0 (-OH) (25 °C)

b) Propiedad terapéutica: enzima co-factor.

1.4.16. RISOFLAVINA-5-FOSFATO (VITAMINA B2)

a) Propiedades fisicoquímicas



C17H20N4O6
PM 376.36

Descripción: cristales amarillos. Inestable a la luz UV por lo que es necesario proteger de ésta.

Solubilidad: soluble en agua a pH 6.9, 112 mg/ml; pH 5.6, 68 mg/ml; pH 3.6, 43 mg/ml.

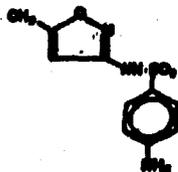
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 267 nm ($A_1 = 820$) y en solución acuosa alcalina 270 nm.

Constante de disociación: pK_a 1.9, 10.2 (20 °C)

b) Propiedad terapéutica: enzima co-factor

1.4.17. SULFAMETOXAZOL

a) Propiedades fisicoquímicas:



N¹-(5-Metilisoxazol-3-il)sulfanilamida
(C₁₀H₁₁N₃O₃S) PM 253.26

Descripción: polvo cristalino blanco, p.f. 168 - 172 °C.

Solubilidad: muy ligeramente soluble en agua, soluble 1:90 metanol, 1:50 etanol, prácticamente insoluble en cloroformo, soluble en sol. ácidas y alcalinas de hidróxidos.

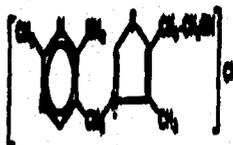
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 265 nm (A₁ = 175), y en solución acuosa alcalina 256 nm (A₁ = 673).

Constante de disociación: pK_a 5.6 (25 ° C)

b) Propiedad terapéutica: antibacteriano

1.4.18. TIAMINA CLORHIDRATO (VITAMINA B1)

a) Propiedades fisicoquímicas:



C₁₂H₁₆Cl₂N₄O₆
PM 337.26

Descripción: cristales incoloros o polvo cristalino blanco, p.f. 248 °C con descomposición.

Solubilidad: soluble 1:1 agua, 1:100 etanol; insoluble en éter y cloroformo; soluble en metanol. Descompone en soluciones a pH arriba de 5.

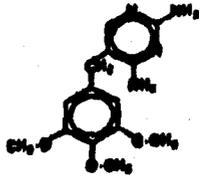
Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 248 nm (A₁ = 450) y en solución acuosa alcalina 232 nm (A₁ = 566).

Constante de disociación: pK_a 4.6 (20 ° C)

b) Propiedad terapéutica: enzima co-factor

1.4.19. TRIMETOPRIM

a) Propiedades fisicoquímicas:



5-(3,4,5-Trimetoxibenzil)pirimidina-2,4-diamina.
(C₁₄H₁₈N₄O₃) PM 290.3

Descripción: polvo cristalino blanco, p.f. 199 - 203 °C.

Solubilidad: soluble en 1:2500 agua, 1:300 etanol, 1:55 cloroformo y 1:80 metanol; soluble en soluciones ácidas y alcalinas.

Espectro ultravioleta: en solución acuosa ácida 271 nm (A₁ = 218) y en solución acuosa alcalina 287 nm (A₁ = 250).

Constante de disociación: pK_a 7.2

b) Propiedad terapéutica: antibacteriano

2.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los polifármacos son productos farmacéuticos que dentro de su rutina de control de calidad presentan la problemática de cuantificación de cada uno de los principios activos presentes en la formulación. En algunos casos es necesario el empleo de algún método de extracción, el cual es una fuente de error e implica tiempos de análisis prolongados, o bien el uso de técnicas de separación como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (en la cual hay que cubrir costos por el manejo de reactivos y equipo) o Cromatografía de Gases (limitada a compuestos de bajo peso molecular termostables); por otra parte en ambas técnicas los tiempos de análisis pueden ser prolongados.

En la actualidad, la espectrofotometría en UV-Vis siendo una técnica de análisis rápida, sencilla y que al estar acoplada a un sistema de multicomponentes por cuantificación del espectro completo podría permitir la determinación de la concentración de los componentes de una mezcla sin efectuar la separación física de los mismos, ofrece ventajas como reducción de costos y tiempos de análisis. Tomando en cuenta lo anterior, es necesario realizar la evaluación de este sistema novedoso con la finalidad de establecer sus limitaciones y ventajas y de esta forma mostrar su utilidad como un método analítico alternativo para el análisis rutinario de polifármacos.

3.0 OBJETIVOS.

Objetivo General:

Evaluar la utilidad del sistema de multicomponentes por cuantificación del espectro completo para el análisis cuantitativo de polifármacos.

Objetivos Particulares:

- Realizar la selección de las formas farmacéuticas que contengan en su formulación de dos a cuatro principios activos, las cuales puedan ser analizadas mediante el sistema.

- Desarrollar y validar los métodos analíticos para las formulaciones seleccionadas.

- Evaluar la aplicabilidad de los métodos desarrollados mediante el análisis de 2 lotes diferentes para cada una de las formas farmacéuticas estudiadas y mediante comparación establecer la robustez de los mismos.

4.0. HIPÓTESIS.

Tomando en cuenta los requisitos que deben cumplir los compuestos para ser cuantificados por el sistema, la aplicabilidad de éste se verá disminuida a un grupo reducido de poliférmacos dentro de los cuales se espera que el sistema opere de forma satisfactoria al efectuar la validación de los métodos desarrollados y evaluar la robustez de los mismos.

5.0. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.1. MATERIAL:

- Matrazos volumétricos de 25, 50, 100, 200 y 2000 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 ml
- Buretas graduadas de 10 ml
- Vasos de precipitados de 50 y 100 ml
- Embudos de filtración
- Papel filtro Whatman No. 5 y 1

5.2. REACTIVOS:

- Metanol absoluto (grado reactivo analítico) Merck
- Etanol absoluto (grado reactivo analítico) Merck
- Ácido clorhídrico (grado reactivo analítico) J.T. Baker
- Agua destilada
- Estándar primario de:
 - Acetaminofén
 - Ácido acetilsalicílico
 - Antipirina
 - Benzocaina
 - Cafeína
 - Cloranfenicol
 - Clorhidrato de Fenilefrina
 - Clorhidrato de Piridoxina (Vit. B6)
 - Clorhidrato de Tiamina (Vit. B1)
 - Diprodamol
 - Espironolactona
 - Furosemida
 - Hidrocortisona
 - Melesito de clorfeniramina
 - Metocarbamol
 - Nicotinamida
 - Riboflavina 5-fosfato de sodio (Vit. B2)
 - Sulfametoxazol
 - Trimetoprim

5.3. EQUIPO.

- Equipo Ultrasonido
- Balanza Analítica
- Balanza microanalítica
- Espectrofotómetro UV-VIS Lambda 2 (PERKIN ELMER)
- Software PECSS Lambda 2 de PERKIN ELMER, Ver. 4.1

5.4. PROCEDIMIENTO

El estudio se realizó en tres etapas, en la primera se determinaron las condiciones óptimas del funcionamiento del sistema seleccionado de las formas farmacéuticas existentes en el mercado algunas de las cuales tenían en formulación de 2 a 4 fármacos.

En la segunda se desarrollaron y validaron los métodos analíticos para las formulaciones en las que se pudieron cuantificar cada uno de los fármacos presentes; y en la tercera se evaluó la robustez de los métodos validados analizando dos lotes diferentes para cada forma farmacéutica.

5.4.1. CALIFICACIÓN DEL EQUIPO

- **Balanza analítica:** se realizó siguiendo el procedimiento señalado por el fabricante.

Resultado: Dentro de especificaciones

- **Balanza microanalítica:** se realizó siguiendo el procedimiento señalado por el fabricante

Resultado: Dentro de especificaciones

- **Espectrofotómetro UV-VIS:**

a) **Exactitud fotométrica:** se realizó empleando una curva de calibración de dicromato de potasio a las concentraciones señaladas por el fabricante.

Resultado: Dentro de especificaciones

b) **Reproducibilidad de la longitud de onda:** método del filtro de Didimio.

Resultado: Dentro de especificaciones

c) **Exactitud de la long. de onda:** método del filtro de óxido de Holmio.

Resultado; Dentro de especificaciones

5.4.2. ETAPA I. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE MULTICOMPONENTES.

Para esta etapa se seleccionaron formulaciones cuyos componentes se caracterizaban por presentar espectros altamente superpuestos; formulaciones donde había gran diferencia de concentración entre componentes; formulaciones que presentaban ambos factores y formulaciones que no presentaban ninguno de ellos.

Tomando en cuenta que el sistema se comporta de forma lineal en un intervalo de absorbancia de 0.2 a 1.6 uA, se prepararon soluciones problema elaboradas con mezclas de fármacos estándar manteniendo la relación de concentraciones de la formulación original, y las cuales fueron diluidas hasta obtener una absorbancia dentro del intervalo lineal; posteriormente se procedió a cuantificarlas mediante la matriz matemática elaborada por el software con las soluciones de referencia (mezclas de fármacos a concentraciones del 90, 100 y 110 % de lo establecido como intervalo lineal de absorbancia). Una vez que se logró cuantificar cada uno de los fármacos en la solución problema, se procedió a cuantificarlos como productos terminado.

Los espectros de la solución problema y estándares se obtuvieron en Absorbancia, Primera y Segunda Derivada para efectuar una evaluación más completa del software cuando se utiliza cualquiera de estos modos.

A continuación se describe la preparación de las soluciones problema, así como de las soluciones de referencia para las diferentes formulaciones estudiadas.

A. FORMULACIONES DONDE LOS FÁRMACOS PRESENTAN GRAN SUPERPOSICIÓN DE ESPECTROS.

Formulación 1

		λ max
Ac. acetilsalicílico	325 mg	228;276 nm.
Metocarbamol	400	222;273

SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de metocarbamol y ac. acetilsalicílico a concentración de 120 ppm c/u en HCl 0.1 N.

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		Mezcla problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Metocarbamol	20 100%	4.20	22 110%	4.60	18 90%	3.75	20	4.20
Ac. Acetilsalicílico	17.9 110%	3.70	14.7 80%	3.10	18.3 100%	3.4	18.3	3.40

Aforo 26 ml

Tabla 3. Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 1.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	HCl 0.1 N
Escala:	0.0 a 1.6 u A
	-1.0 a 0.3 u en Primera Derivada
	-0.15 a 0.12 u en Segunda Derivada
Barrido:	300 a 200 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	214 a 300 nm en Absorbencia
	219 a 300 nm en Primera Derivada
	210 a 300 nm en Segunda Derivada

Formulación 2

		λ max
Dipiridamol	75 mg	294 nm
Ac. acetilsalicílico	50	297

SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de dipiridamol y ac. acetilsalicílico a concentraciones de 75 y 50 ppm respectivamente en NaOH 0.1 N

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		Mezcla problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Dipiridamol	7.5 100%	2.50	8.25 110%	2.75	6.75 90%	2.40	7.5	2.50
Ac. Acetilsalicílico	5.5 110%	2.75	4.5 90%	2.25	5.0 100%	2.5	5.0	2.50

Aforo: 25 ml

Tabla 4. Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 2.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	NaOH 0.1 N
Escala:	0.0 a 0.5 u de Absorbancia -0.3 a 0.11 u en Primera Derivada -0.03 a 0.03 u en Segunda Derivada
Barrido:	360 a 225 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	265 a 340 nm en Absorbancia 278 a 340 nm en Primera Derivada 278 a 340 nm en Segunda Derivada

B. FORMULACIONES DONDE LOS FÁRMACOS PRESENTAN GRAN DIFERENCIA DE CONCENTRACIONES.

Formulación 3

		λ max.
Clorh. de amantidina	50 mg	No Absorbe
Clorh. de fenilefrina	5	272 nm
Maleato de clorfeniramina	2	265
Ac. acetilsalicílico	350	276

SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de clorh. de fenilefrina, maleato de clorfeniramina y Ac. acetilsalicílico a concentraciones de 20.0, 10.0 y 400 ppm respectivamente en HCl 0.1 N

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		Mezcla problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
C. de Fenilefrina	2.5 100%	3.10	2.75 110%	3.4	2.25 90%	2.8	2.5	3.1
Ac. Acetilsalicílico	157.5 90%	9.90	175 100%	10.90	192.5 110%	12.0	175	10.90
M. de Clorfeniramina	1.1 110%	2.80	0.9 90%	2.30	1.0 100%	2.5	1.0	2.5

Aforo: 25 ml

Tabla 5. Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 3.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	HCl 0.1 N
Escala:	0.0 a 1.5 u de Absorbancia -0.15 a 0.06 u en Primera Derivada -0.02 a 0.02 u en Segunda Derivada
Barrido:	320 a 210 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	246 a 300 nm en Absorbancia 263 a 300 nm en Primera Derivada 244 a 300 nm en Segunda Derivada.

Formulación 4

		λ max
Nifuroxime	4.24 mg	337
Hidrocloruro de Hidrocortisona	2.5	241
Antipirina	50.0	270
Benzocaína	50.0	294

SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de nifuroxime e hidrocloruro de Hidrocortisona a 10 ppm; antipirina y benzocaína a 200 ppm en etanol.

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIONES PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		s4		Mezcla Problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Nifuroxime	2.1 100%	5.3	2.1 100%	5.3	1.9 90%	4.8	2.3 110%	5.8	2.1	5.3
Hidrocloruro de Hidrocortisona	1.1 90%	2.8	1.4 110%	3.5	1.3 100%	3.3	1.3 100%	3.3	1.3	3.3
Antipirina	25 100%	3.1	22.5 90%	2.8	27.5 110%	3.4	25 100%	3.1	25	3.1
Benzocaína	27.5 110%	3.4	25 100%	3.1	25 100%	3.1	22.5 90%	2.8	25	3.1

Aforo: 25 ml

Tabla 6. Preparación de las soluciones problema y de referencia de la formulación 4.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	Etanol
Escala:	0.0 a 3.5 u de Absorbancia -1.6 a 1.1 u en Primera Derivada -0.2 a 0.2 u en Segunda Derivada
Barrido:	400 a 210 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	216 a 400 nm en Absorbancia 241 a 400 nm en Primera derivada

C. FORMULACIONES DONDE LOS FÁRMACOS PRESENTAN GRAN DIFERENCIA DE CONCENTRACIÓN Y SUPERPOSICIÓN DE ESPECTROS.

Formulación 5

		λ max
Acetaminofén	300 mg	246 nm
Cafeína	25	272
Clorh. de Fenilefrina	4	273
Meleato de Clorfeniramina	4	263

SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de acetaminofén y cafeína a concentraciones de 300 y 40 ppm; clorh. de fenilefrina y m. de clorfeniramina a 10 ppm en HCl 0.1 N.

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		s4		Mezcla Problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Acetaminofén	75 100%	0.3	75 100%	0.3	67.5 90%	5.0	82.5 110%	0.0	75	0.3
Cafeína	5.0 90%	3.5	6.0 110%	4.3	6.3 100%	3.0	6.3 100%	3.0	6.3	3.0
Clorh. Fenilefrina	1.1 110%	2.0	1.0 100%	2.5	1.0 100%	2.5	0.6 90%	2.3	1.0	2.5
M. clorfeniramina	1.0 100%	2.5	0.9 90%	2.3	1.1 110%	2.0	1.0 100%	2.5	1.0	2.5

Alícuo: 25 ml

Tabla 7. Preparación de las soluciones problema y referencia de la formulación 5.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	HCl 0.1 N
Escala:	0.0 a 0.7 u de Absorbancia -0.3 a 0.2 u en Primera Derivada -0.05 a 0.05 u en Segunda Derivada
Barrido:	300 a 200 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	220 a 305 nm en Absorbancia 242 a 312 nm en Primera Derivada 231 a 313 nm en Segunda Derivada.

D. FORMULACIONES DONDE LOS FÁRMACOS SON CUANTIFICABLES EN LA MEZCLA DE ESTÁNDARES PUROS, PERO NO EN LA FORMA FARMACÉUTICA.

Formulación 6

	c/ml	λ max
Maleato de clorfeniramina	2.0 mg	263 nm
Clorh. de fenilpropanolamina	5.0	Abs no significativa
Acetaminofén	20.0	243
Cafeína	2.5	272
Vehículo c.b.p.	1.0 ml	

SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de m. de clorfeniramina, acetaminofén y cafeína a concentraciones de 20, 200 y 20 ppm respectivamente en 0.1 N.

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: se prepararon de acuerdo a la sig. table:

Fármaco	s1		s2		s3		Mezcla problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Acetaminofén	22 110%	2.8	18 90%	2.3	20 100%	2.5	20	2.5
Cafeína	2.3 90%	3.8	2.5 100%	3.1	2.8 110%	3.5	2.5	3.1
Maleato de Clorfeniramina	2.0 100%	2.5	2.2 110%	2.8	1.8 90%	2.3	2.0	2.8

Aforo: 25 ml

Tabla 6. Preparación de soluciones problema y referencia para la formulación 6.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	HCl 0.1 N
Escala:	0.0 a 1.6 u de Absorbancia -0.56 a 0.4 u en Primera Derivada -0.1 a 0.1 u en Segunda Derivada
Barrido:	300 a 210 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	220 a 300 nm en Absorbancia 242 a 312 nm en Primera Derivada 231 a 313 nm en Segunda Derivada

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: La muestra fue preparada a partir de una mezcla homogénea de solución pediátrica siguiendo el sig. diagrama:

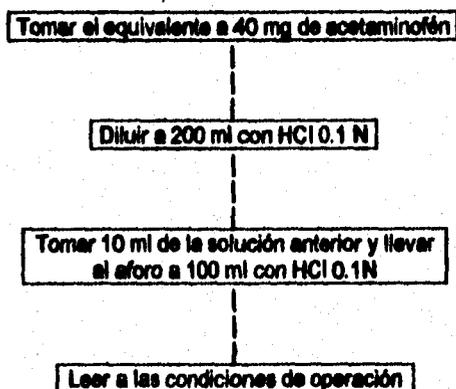


Diagrama 1. Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de una solución pediátrica, para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 6)

Formulación 7

	c/ml	λ max
Clorh. de tiamina	3.0 mg	246 nm
Riboflavina-5-fosfato	3.0	223,267,376
Nicotinamida	20	261
Clorh. de piridoxina	4.0	291
Pantenol	10	No Absorbe
Vehículo c.b.p.	1 ml	

SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de clorh. de tiamina, riboflavina-5-fosfato, nicotinamida y clorh. de piridoxina a concentraciones de 40, 40, 80 y 40 ppm respectivamente en HCl 0.1N

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		s4		Mezcla Problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Tiamina	3.0 100%	1.9	3.0 100%	1.9	2.7 90%	1.7	3.3 110%	2.1	3.0	1.9
Piridoxina	4.4 110%	2.6	4.0 100%	2.5	4.0 100%	2.5	3.6 90%	2.3	4.0	2.5
Riboflavina	2.7 90%	1.7	3.3 110%	2.1	3.0 100%	1.9	3.0 100%	1.9	3.0	1.9
Nicotinamida	20 100%	6.3	16 80%	5.8	22 110%	6.9	20 100%	6.3	20	6.3

Aforo: 25 ml

Tabla 8. Preparación de las soluciones problema y de referencia de la formulación 7.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	HCl 0.1 N
Escala:	0.0 a 1.0 u de Absorbancia -0.4 a 0.4 u en Primera Derivada -0.13 a 0.05 u en Segunda Derivada
Barrido:	400 a 200 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	213 a 400 nm en Absorbancia 252 a 320 nm en Primera Derivada 210 a 308 nm en Segunda Derivada

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: La muestra fue preparada a partir de una mezcla homogénea de solución inyectable siguiendo el sig. diagrama:

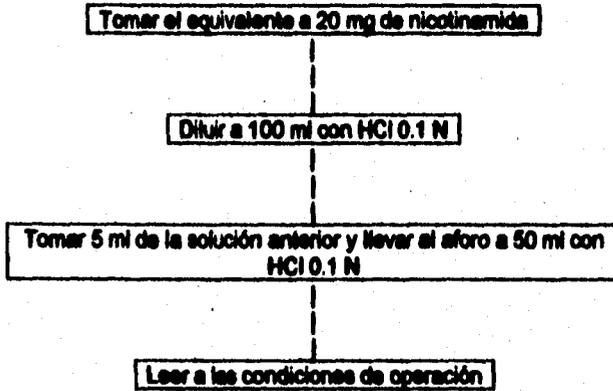


Diagrama 2. Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de una solución inyectable, para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 7)

E. FORMULACIONES CON FÁRMACOS QUE SON CUANTIFICABLES EN LA MEZCLA DE ESTÁNDARES Y COMO PRODUCTO TERMINADO,

Formulación 8

	c/cápsula	λ max
Espironolactona	50 mg	238 nm
Furosemida	20	234,273
Excipiente c.b.p.	1 cápsula	

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de espironolactona y furosemida a concentraciones de 80 y 40 ppm respectivamente en etanol.

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		Mezcla problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Furosemida	5.5 110%	3.4	4.5 90%	2.8	5.0 100%	3.1	5.0	3.1
Espironolactona	12.5 100%	3.9	13.8 110%	4.3	11.3 90%	3.5	12.5	3.9

Aforo: 25 ml

Tabla 10. Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 8.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	Etanol
Escala:	0.0 a 1.5 u de Absorbancia
	-1.5 a 0.5 u en Primera Derivada
	-0.5 a 0.3 u en Segunda Derivada
Barrido:	380 a 200 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	205 a 375 nm en Absorbancia
	223 a 297 nm en Primera Derivada
	220 a 288 nm en Segunda Derivada

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: La muestra fue preparada a partir de una mezcla homogénea de polvo (contenido de 20 cápsulas) con el sig. diagrama:

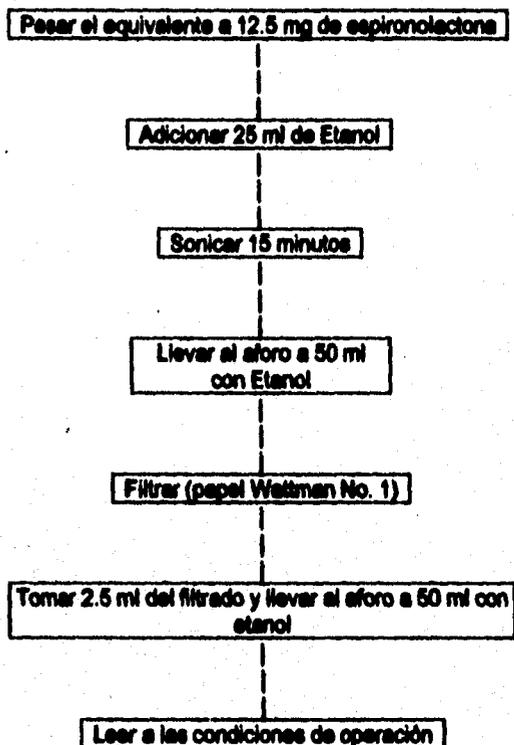


Diagrama 3. Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de la mezcla homogénea del contenido de 20 cápsulas para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 8)

Formulación 9

	g/100 ml	λ max
Hidroocortisona	1.0 g	247 nm
Cloranfénicol	2.5	277
Benzocaína	2.0	285
Vehículo c.b.p.	100 ml	

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de hidroocortisona, cloranfenicol y benzocaína a concentraciones de 40, 100 y 100 ppm respectivamente en agua destilada.

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		Mezcla problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Hidroocortisona	4.6 90%	2.8	5.6 110%	3.4	5.0 100%	3.1	6.0	3.1
Cloranfénicol	12.6 100%	3.1	11.3 90%	2.8	13.8 110%	3.5	12.6	3.1
Benzocaína	11.0 110%	2.75	10.0 100%	2.5	9.0 90%	2.25	10.0	2.5

Aforo: 25 ml

Tabla 11. Preparación de las soluciones problema y de referencia para la formulación 9.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	Agua destilada
Escala:	0.0 a 1.5 u de Absorbancia
	-0.5 a 0.4 u en Primera Derivada
	-0.11 a 0.07 u en Segunda Derivada
Barrido:	340 a 200 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	218 a 340 nm en Absorbancia
	213 a 340 nm en Primera Derivada
	209 a 340 nm en Segunda Derivada

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: La muestra fue preparada a partir de una mezcla homogénea de solución ótica con el sig. diagrama:

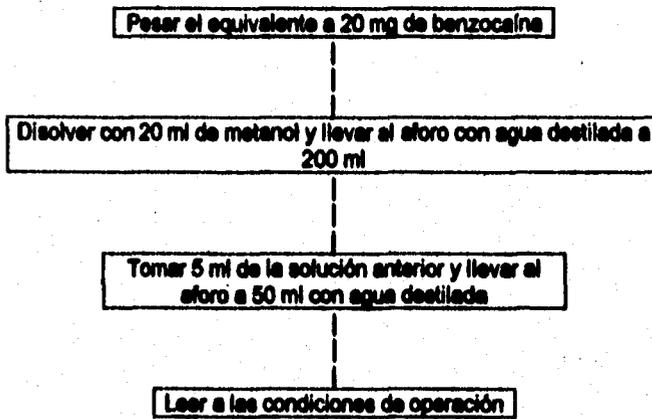


Diagrama 4. Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de la mezcla homogénea de solución ótica para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 9)

Formulación 10

	c/tableta	λ max
Sulfametoxazol	400 mg	271 nm
Trimetoprim	80	266
Excipiente c.b.p.	1 tab.	

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PATRÓN: Se prepararon soluciones patrón de sulfametoxazol y trimetoprim a concentraciones de 200 y 50 ppm respectivamente en HCl 0.1 N

SOLUCIONES DE REFERENCIA Y SOLUCIÓN PROBLEMA: Se prepararon de acuerdo a la sig. tabla:

Fármaco	s1		s2		s3		Mezcla problema	
	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml	ppm	ml
Sulfametoxazol	44 110%	8.8	38 95%	4.5	40 100%	5.0	40	5.0
Trimetoprim	8 100%	4.0	8.8 110%	4.4	7.2 90%	3.6	8	4.0

Aforo: 25 ml

Tabla 12. Preparación de las soluciones problema y de referencia de la formulación 10.

CONDICIONES DE OPERACIÓN:

Blanco:	HCl 0.1 N
Escala:	0.0 a 0.5 u de Absorbancia -0.47 a 0.05 u en Primera Derivada -0.02 a 0.03 u en Segunda Derivada
Barrido:	320 a 240 nm
Veloc. de barrido:	240 nm/min
Intervalo long. de onda:	1 nm
Intervalo de análisis:	240 a 315 nm en Absorbancia 244 a 315 nm en Primera Derivada 244 a 316 nm en Segunda Derivada.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: La muestra fue preparada a partir de una mezcla homogénea de polvo proveniente de 20 tabletas con el sig. diagrama:

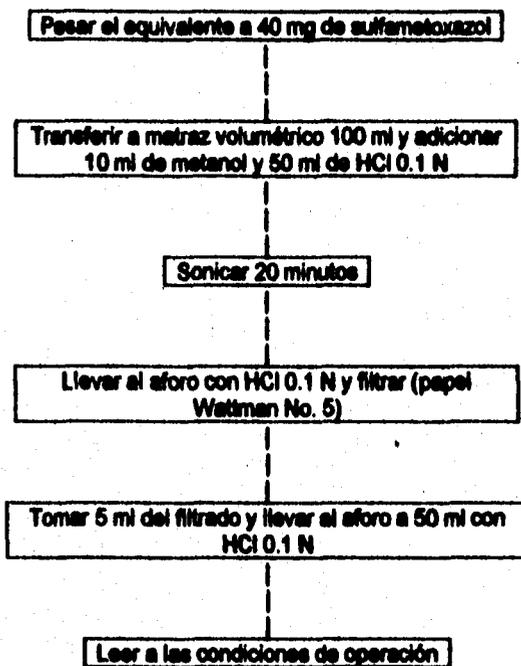


Diagrama 6. Procedimiento de preparación de la solución problema, a partir de la mezcla homogénea del polvo proveniente de 20 tabletas para el análisis de multicomponentes por CEC (formulación 10)

Todos los estándares así como las soluciones problema se prepararon y analizaron por triplicado.

5.4.3. ETAPA II. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LAS FORMULACIONES 8, 9 Y 10.

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.

Debido a que los mejores resultados para la cuantificación de los fármacos en la formulación se obtuvieron en el modo de absorbancia, todos los parámetros de validación se evaluaron con las condiciones de este modo establecidos en el punto 5.4.2.E.

a) **LINEALIDAD DEL SISTEMA:** se determinó construyendo una curva de calibración mg Adicionados vs mg Recuperados utilizando cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis por triplicado para cada dilución.

El intervalo de concentraciones analizado incluyó soluciones al 80, 90, 100, 110 y 120 % de cada fármaco en cada formulación.

Concentraciones: 10.0, 11.3, 12.5, 13.8 y 15.0 ppm de Espironolactona y 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0 ppm de Furosemida (formulación 8).

4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0 ppm de Hidrocortisona; 10.0, 11.25, 12.5, 13.75 y 15.0 ppm de Cloranfenicol y 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 y 12.0 ppm de Benzocaína (formulación 9)

32.0, 36.0, 40.0, 44.0 y 48 ppm de Sulfametoxazol y 6.4, 7.2, 8.0, 8.8 y 9.6 ppm de Trimetoprim (formulación 10).

b) **PRECISIÓN DEL SISTEMA:** se determinó por el análisis sextuplicado de la misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

Concentraciones: para la formulación 8: 12.5 ppm de Espironolactona y 5.0 ppm de Furosemida; formulación 9: 5.0 ppm de Hidrocortisona, 12.5 ppm de Cloranfenicol y 10.0 ppm de Furosemida; formulación 10: 40.0 ppm de Sulfametoxazol y 8.0 ppm de Trimetoprim.

c) **LINEALIDAD DEL MÉTODO:** se determinó a partir de placebos adicionados de cada formulación con cinco cantidades diferentes de cada uno de los fármacos en cada formulación de manera independiente y haciendo el análisis por triplicado, el mismo analista y bajo las condiciones de operación señaladas en el punto 5.4.2.E (en el modo de Absorbancia).

Concentraciones: para las tres formulaciones se emplearon las mismas concentraciones establecidas en la linealidad del sistema.

Se obtuvo la cantidad de activo recuperado para construir una gráfica de Cantidad Adicionada vs Cantidad Recuperada y se recurrió al análisis de regresión lineal y estadístico para determinar el dictamen de validación de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos.

d) EXACTITUD DEL MÉTODO: se determinó analizando 6 placebo de cada formulación, cargados de manera independiente con cada uno de los fármacos involucrados. El análisis se hizo en las mismas condiciones de operación establecidas en el punto 5.4.2.E (en el modo de Absorbancia) y por el mismo analista.

Concentraciones: la concentración final analizada en la formulación 8: 12.5 ppm de Espironolactona y 5.0 ppm de Furosemida; en la formulación 9: 5.0 ppm de Hidrocortisona, 10.0 ppm de Benzocaína y 12.5 ppm de Cloranfenicol; en la formulación 10: 40.0 ppm de Sulfametoxazol y 8.0 ppm de Trimetoprim.

e) PRECISIÓN DEL MÉTODO (Repetibilidad y Reproducibilidad al 100%): se determinó de una muestra homogénea de cada formulación cuya cantidad teórica de los principios activos en cada una de ellas fuese aproximadamente el 100 %. Se analizó por triplicado, por dos analistas, en dos días diferentes.

Concentraciones: las concentraciones analizadas para las tres formulaciones fueron las mismas establecidas en la exactitud del método.

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico (análisis de la varianza) para poder compararlos con los criterios de aceptación establecidos y así determinar el dictamen de validación.

f) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA: Se utilizaron las soluciones con las que se determinó la exactitud del método, sometiéndolas a ausencia de luz y temperatura ambiente, por 24 horas.

5.4.4. ETAPA III. EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS VALIDADOS.

La evaluación se realizó analizando dos lotes diferentes de cada formulación por dos analistas en dos días diferentes. La concentración de la solución final analizada involucró el 100 % de cada uno de los principios activos de interés establecido en la exactitud del método.

Los datos obtenidos fueron comparados para su interpretación y conclusión final.

6.0. RESULTADOS.

6.1. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL SISTEMA DE MULTICOMPONENTES.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la primera etapa del estudio. Los datos se muestran de forma comparativa en los tres modos (absorbancia, primera y segunda derivada); los espectros obtenidos a concentraciones de 10 ppm se superpusieron para facilitar el análisis de resultados y se encuentran localizados en el ANEXO I.

6.1.1. ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES PARA FÁRMACOS CON GRAN SUPERPOSICIÓN DE ESPECTROS.

Formulación	Fármaco	% Recuperado Absorbancia	% Recuperado Prim. Deriv.	% Recuperado Seg. Deriv.
1	Ac. Acetilsalicílico	102.4	102.6	95.4
	Metocarbamol	66.3	66.4	78.3
2	Ac. Acetilsalicílico	109.8	96.9	N.C.*
	Dipiridamol	215.3	59.1	N.C.

*N.C. No cuantificable

Tabla 13. Comparación de los % de recobro para fármacos con gran superposición de espectros en los tres modos espectrofotométricos de análisis.

Dicamen: el sistema no es capaz de cuantificar de manera precisa y exacta en ninguno de sus tres modos, aquellos fármacos presentes en una mezcla donde la diferencia entre sus máximos de absorbancia sea hasta 3 nm.

6.1.2. ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES PARA FÁRMACOS QUE PRESENTAN GRAN DIFERENCIA DE CONCENTRACIÓN.

Formulación	Fármaco	% Recuperado Absorbancia	% Recuperado Prim. Deriv.	% Recuperado Seg. Deriv.
3	Ac. Acetilsalicílico	87.8	101.9	102.5
	M. Clorfeniramina	119.4	97.5	117.3
	C. Fenilefrina	129.3	123.6	99.0
4	Nifuroxíma	87.5	70.9	N.C.
	Hidrocortisona	74.0	24.9	N.C.
	Antipirina	100.2	98.0	N.C.
	Benzocafina	99.7	97.8	N.C.

*N.C. No cuantificable

Tabla 14. Comparación de los % de recobro para fármacos que presentan gran diferencia de concentración en formulación.

Dietamen: el sistema no es capaz de cuantificar con precisión y exactitud, en ninguno de sus tres modos, aquellos fármacos presentes en una mezcla donde la diferencia entre sus concentraciones sea mayor a 10 veces la concentración mínima de uno de ellos.

6.1.3. ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES PARA FÁRMACOS QUE PRESENTAN GRAN DIFERENCIA DE CONCENTRACIONES Y ADEMÁS GRAN SUPERPOSICIÓN DE ESPECTROS.

Formulación	Fármaco	% Recuperado Absorbancia	% Recuperado Prim. Deriv.	% Recuperado Seg. Deriv.
5	Acetaminofén	98.5	98.2	98.8
	Cafeína	105.3	101.5	99.8
	M. Clorfeniramina	128.2	119.2	110.3
	C. Fenilefrina	99.8	97.2	127.1

Tabla 15. Comparación de los % de recobro para fármacos que presentan gran diferencia de concentraciones y superposición de espectros.

Dietamen: el sistema no es capaz de cuantificar con precisión y exactitud, en ninguno de sus tres modos, aquellos fármacos presentes en una mezcla donde la diferencia entre sus máximos de absorbancia sea hasta 3 nm y la diferencia entre sus concentraciones sea mayor a 10 veces la concentración mínima de uno de ellos.

6.1.4. ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES PARA FÁRMACOS QUE SON CUANTIFICABLES EN MEZCLA DE ESTÁNDARES PUROS PERO NO EN LA FORMA FARMACÉUTICA.

Fomulación	Fármaco	% Recuperado Absorbencia	% Recuperado Prim. Deriv.	% Recuperado Sec. Deriv.
6	M. Clorfeniramina	101.8 173.5*	101.8 259.2*	101.8 166.5*
	Acetaminofén	100.9 104.2*	100.9 105.6*	100.5 98.1*
	Cafeína	102.9 109.1*	101.9 59.9*	99.5 77.0*
7	Tiamina	101.58 120.1*	102.54 148.1*	108.55 N.C.**
	Riboflavina	100.83 124.2*	101.38 N.C.**	100.58 119.5*
	Nicotinamida	100.34 88.6*	100.19 148.6*	99.9 76.2*
	Piridoxina	100.21 188.3*	100.76 58.1*	101.97 55.0*

* % recuperado en la forma farmacéutica

** No cuantificable

Tabla 16. Comparación de los % de recobro para fármacos que son cuantificables en una mezcla de estándares puros, pero no en la forma farmacéutica.

Dictamen: el sistema no es capaz de cuantificar con precisión y exactitud, en ninguno de sus tres modos, aquellos fármacos presentes en una forma farmacéutica donde exista interferencia por parte de los excipientes de la formulación.

6.1.6. ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES PARA FÁRMACOS QUE SON CUANTIFICABLES EN MEZCLA DE ESTÁNDARES PUROS Y EN LA FORMA FARMACÉUTICA.

Formulación	Fármaco	% Recuperado Absorbencia	% Recuperado Prim. Deriv.	% Recuperado Seg. Deriv.
8	Esproneolona	100.6 99.9*	97.1 102.3*	108.9 117.8*
	Furosemina	99.4 97.7*	99.2 91.4*	99.2 87.1*
9	Hidroclorona	103.7 95.4*	99.2 112.7*	94.4 122.9*
	Cloranfenicol	100.7 92.3*	99.1 107.9*	99.8 109.3*
	Benzocaína	99.1 103.5*	100.2 96.4*	99.8 96.2*
10	Sulfametoxazol	100.65 99.7*	99.1 101.1*	99.9 148.5*
	Trimetoprim	99.73 98.58*	101.9 99.1*	100.9 28.8*

* % recuperado en la forma farmacéutica

Tabla 17. Comparación de los % de recobro para fármacos que son cuantificables en una mezcla de estándares puros y en la forma farmacéutica.

Dictamen: el sistema es capaz de cuantificar con precisión, en el modo de absorbencia, aquellos fármacos presentes en una mezcla de estándares así como en su forma farmacéutica, donde la diferencia entre sus concentraciones es menor a 8 veces la concentración mínima de uno de ellos y además no existe interferencia por parte de los excipientes de la formulación.

6.2. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LAS FORMULACIONES 8, 9 Y 10.

Los resultados que a continuación se presentan fueron evaluados estadísticamente mediante las fórmulas y criterios de aceptación del ANEXO III para efectuar los dictámenes correspondientes. Los gráficos correspondientes a la linealidad del sistema y del método se encuentran en el ANEXO II.

6.2.1. FORMULACIÓN 8

a) PRECISIÓN DEL SISTEMA

ESPIRONOLACTONA % Recuperado	FUROSEMIDA % Recuperado
100.00	101.66
101.24	101.79
101.07	101.48
101.21	101.77
101.56	101.87
102.06	100.28
X = 101.36 % CV = 0.4004 %	X = 101.77 % CV = 0.1977 %
Criterio de Aceptación: CV ≤ 1.5 %	

Tabla 18. Valores obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema de medición para espirolactona y furosemida

Dictamen: el sistema es preciso para ambos fármacos ya que los CV correspondientes son menores a 1.5 %.

b) LINEALIDAD DEL SISTEMA

Los datos enlistados son el promedio de 3 determinaciones para cada punto y los intervalos de Confianza fueron estimados con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

ESPIRONOLACTONA				
% Adicionado	mg Adicionados	mg Recuperados	Resultados	Crit. de aceptación
80	10.0	9.6590	CV = 0.3812 % $r^2 = 0.9996$ b = -1.1680	< 1.5 % > 0.98 = 0.0
90	11.3	11.2020		
100	12.5	12.5922		
110	13.8	14.0072		
120	15.0	15.3271		

IC para la ordenada al origen: -1.3576 a -0.9744
tcalc = -13.1493 tcrit = 2.1604

Tabla 19. Evaluación de la linealidad del sistema para espirolactona.

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	24571.4515	4.67	$F_{cal}(reg) \geq F_{crit}(reg)$
Falta de ajuste	2.4179	3.71	$F_{cal}(fa) \leq F_{crit}(fa)$

Tabla 20. ANOVA para la linealidad del sistema (espronolectona).

Diotamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , $F_{cal}(reg)$ y $F_{cal}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del sistema.

FUROSEMIDA

% Adicionado	mg Adicionados	mg Recuperados	Resultados	Crit. de aceptación
60	4.0	4.0020	$CV = 0.7248 \%$ $r^2 = 0.9979$ $b = -0.3941$	$< 1.5 \%$ > 0.98 $= 0.0$
80	4.5	4.5291		
100	5.0	5.0321		
110	5.5	5.6079		
120	6.0	6.1157		

IC para la ordenada al origen: -0.3941 a -0.1020

$t_{calc} = -3.6704$

$t_{crit} = 2.1604$

Tabla 21. Evaluación de la linealidad del sistema para furosemida.

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	6297.8018	4.67	$F_{cal}(reg) \geq F_{crit}(reg)$
Falta de ajuste	0.0038	3.71	$F_{cal}(fa) \leq F_{crit}(fa)$

Tabla 22. ANOVA para la linealidad del sistema (furosemida).

Diotamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , $F_{cal}(reg)$ y $F_{cal}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del sistema.

Las gráficas correspondientes a la linealidad del sistema para espronolectona y furosemida se representan en las fig. 6.1 y 6.2.

c) EXACTITUD DEL MÉTODO

ESPIRONOLACTONA % Recuperado	FUROSEMIDA % Recuperado
102.91	100.66
101.10	100.75
101.61	99.17
100.39	99.33
100.99	97.38
101.64	99.85
X = 101.49 % CV = 0.0641 %	X = 99.8233 % CV = 1.2436

Criterio de aceptación: promedio de recobro 97 - 103 %; CV ≤ 3 %

Tabla 23. Valores obtenidos en la evaluación de la exactitud del método para espirolactona y furosemida

Dictamen: el método es exacto para ambos fármacos ya que los promedios de recobro se encuentran dentro del intervalo establecido para métodos espectrofotométricos y el CV < 3 %.

d) LINEALIDAD DEL MÉTODO

Los datos enlistados son el promedio de 3 determinaciones para cada punto y los intervalos de confianza fueron estimados con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

ESPIRONOLACTONA

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	Resultados	Crit. de aceptación
9.97	9.8213	99.51	%R = 100.2	97 - 103 %
11.01	10.9216	99.20	m = 1.0702	= 1.0
12.34	12.2784	99.50	b = -0.9259	= 0.0
13.72	13.8300	100.80	r ² = 0.9973	> 0.99
14.81	15.1042	101.99		

IC para la ordenada al origen: -1.2436 a -0.4060

IC para la pendiente : 1.03672 a 1.1037

tcalc(m) = 4.5296 ; tcalc(b) = -4.4271

tcrit = 2.1604

Tabla 24. Evaluación de la linealidad del método para espirolactona.

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	4788.8221	4.87	$F_{cal}(reg) \geq F_{crit}(reg)$
Falta de ajuste	3.8716	3.71	$F_{cal}(fa) \leq F_{crit}(fa)$

Tabla 25. ANOVA para la linealidad método (espironolactona)

Dicetamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , la media aritmética del %R, $F_{cal}(reg)$ y $F_{cal}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

FUROSEMIDA

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	Resultados	Crit. de aceptación
3.84	3.8601	100.28	%R = 100.6	97 - 103 %
4.38	4.3828	100.29	m = 1.04282	= 1.0
4.82	4.8032	99.86	b = -0.1791	= 0.0
5.48	5.5211	101.12	$r^2 = 0.9974$	> 0.98
5.90	5.8931	101.58		

IC para la ordenada al origen: -0.3364 a -0.0219

IC para la pendiente : 1.0113 a 1.0746

tcalc(m) = 2.8311 ; tcalc(b) = -2.4812

tcrit = 2.1604

Tabla 26. Evaluación de la linealidad del método para furosemida

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	6073.9844	4.87	$F_{cal}(reg) \geq F_{crit}(reg)$
Falta de ajuste	2.8172	3.71	$F_{cal}(fa) \leq F_{crit}(fa)$

Tabla 27. ANOVA para la linealidad método (furosemida)

Dicetamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , la media aritmética del %R, $F_{cal}(reg)$ y $F_{cal}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

Las gráficas correspondientes a la linealidad del método para Espironolactona y Furosemida se representan en las fig. 6.3 y 6.4.

e) PRECISIÓN DEL MÉTODO

ESPIRONOLACTONA		
ANALISTA		
DIA	1	2
1	101.10	101.20
	101.81	101.50
	100.39	100.84
2	100.88	100.84
	101.87	101.82
	100.78	101.83

$$Cv_{total} = 0.4811$$

Tabla 28. Evaluación de la repetibilidad del método para espirolactona

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Analista	2.0838	18.81	$F_{cal}(anal) \leq F_{crit}(anal)$
Día	0.0001	4.48	$F_{cal}(día) \leq F_{crit}(día)$

Tabla 29. ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (espirolactona)

Dictamen: El método es repetible ya que el Cv_{total} es menor al 3 % y como $F_{cal}(anal)$ y $F_{cal}(día)$ son menores a sus F_{crit} correspondientes, el método analítico es reproducible por los analistas en distintos días por un mismo analista.

FUROSEMIDA		
ANALISTA		
DIA	1	2
1	100.75	101.88
	99.17	101.58
	99.33	100.29
2	101.28	99.82
	101.78	101.88
	101.22	102.15

$$Cv_{total} = 0.9888$$

Tabla 30. Evaluación de la repetibilidad del método para furosemida

Fuente de variación	F _{cal}	F _{crit}	Crit. de aceptación
Analista	0.5407	18.51	F _{cal(ana)} ≤ F _{crit(ana)}
Día	2.8173	4.48	F _{cal(día)} ≤ F _{crit(día)}

Tabla 31. ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (furosemida)

Dictamen: El método es repetible ya que el Cv_{total} es menor al 3 % y como $F_{\text{cal}}(\text{ana})$ y $F_{\text{cal}}(\text{día})$ son menores a sus F_{crit} correspondientes, el método analítico es reproducible por los analistas en distintos días por un mismo analista.

④ ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

Resultado: $\%R(\bar{x}_0) = 101.8 \%$ para espiroprolactona
 $= 101.6 \%$ para furosemida

Criterio de aceptación: $\%R = 97 - 103 \%$

Dictamen: La muestra analítica fue estable a temperatura ambiente por lo menos durante 24 horas después de su preparación ya que el valor promedio del $\%R$ se encuentra entre 97 y 103 %.

TABLA 52 RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DE LA FORMULACIÓN 6

PRECISIÓN DEL SISTEMA	LINEALIDAD DEL SISTEMA	EXACTITUD DEL MÉTODO	LINEALIDAD DEL MÉTODO	PRECISIÓN DEL MÉTODO
ESPIRONOLACTONA				
X = 101.38 % DE= 0.4989 CV= 0.4984	m= 1.0883 IC= 1.0842 a 1.1145 For(Reg)= 24671.45 $t_{\text{reg}} = 188.7828$ b= -1.1880 IC= -1.3578 a -0.8744 For(FA)= 2.4179 $t_{\text{reg}} = -13.1498$ $r^2 = 0.9998$	X= 101.48 % DE= 0.8770 CV= 0.8841 IC= 100.87 a 102.41 %	m= 1.0702 IC= 1.0987 a 1.1037 For(Reg)= 4780.82 $t_{\text{reg}} = 4.5288$ b= -0.8288 IC= -1.2435 a -0.4080 For(FA)= 3.6716 $t_{\text{reg}} = -4.2708$ $r^2 = 0.9973$	For(Anal)= 2.0839 For(A/D)= 0.6881 CV(Anal)= 0.4811
FUROSEMIDA				
X = 101.77 % DE= 0.2013 CV= 0.1977	m= 1.0812 IC= 1.0823 a 1.0802 For(Reg)= 6287.80 $t_{\text{reg}} = 78.2967$ b= -0.2481 IC= -0.3841 a -0.1020 For(FA)= 0.8038 $t_{\text{reg}} = -3.6704$ $r^2 = 0.9878$	X= 99.82 % DE= 1.2377 CV= 1.2438 IC= 98.22 a 100.82 %	m= 1.0428 IC= 1.0113 a 1.0745 For(Reg)= 5073.38 $t_{\text{reg}} = 2.9311$ b= -0.1781 IC= -0.3884 a -0.0218 For(FA)= 2.6172 $t_{\text{reg}} = -2.4812$ $r^2 = 0.9874$	For(Anal)= 0.5407 For(A/D)= 2.6173 CV(Anal)= 0.8888
VALORES DE TABLAS	t(0.05)= 2.1604 For(Reg)= 4.67 For(FA)= 3.71		t(0.05)= 2.1604 For(Reg)= 4.67 For(FA)= 3.71	For(Anal)= 18.51 For(A/D)= 4.46

6.2.2. FORMULACIÓN 9

a) PRECISIÓN DEL SISTEMA.

HIDROCORTISONA % Recuperado	CLORANFENICOL % Recuperado	BENZOCAINA % Recuperado
100.51	101.35	99.99
100.27	101.82	99.72
100.35	99.93	100.30
100.68	102.99	99.77
99.60	101.83	100.54
99.88	101.22	101.05
X = 100.22 % CV = 0.4028 %	X = 101.40 % CV = 0.8892 %	X = 100.22 % CV = 0.5103 %

Criterio de aceptación: $CV \leq 1.5 \%$

Tabla 33. Valores obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema de medición para hidrocortisona, cloranfenicol y benzocaína.

Dicamen: el sistema es preciso para los tres fármacos ya que los CV correspondientes son menores a 1.5 %.

b) LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Los datos enlistados son el promedio de 3 determinaciones para cada punto y los intervalos de confianza fueron estimados con un nivel de significancia $\alpha=0.05$

HIDROCORTISONA

% Adicionado	mg Adicionados	mg Recuperados	Resultados	Crit. de aceptación
80	4.0	4.9301	CV = 0.8072 % $r^2 = 0.9972$ b = 0.00420	< 1.5 % > 0.99 = 0.0
90	4.5	4.5428		
100	5.0	5.0777		
110	5.5	5.5901		
120	6.0	6.0303		

IC para la ordenada al origen: -0.1593 a 1.04210

$t_{calc} = 0.05584$

$t_{crit} = 2.1604$

Tabla 34. Evaluación de la linealidad del sistema para hidrocortisona

Fuente de variación	Fca1	Fca2	Crit. de aceptación
Regresión	4586.9445	4.67	$F_{ca1}(reg) \geq F_{ca2}(reg)$
Falta de ajuste	2.2734	3.71	$F_{ca1}(fa) \leq F_{ca2}(fa)$

Tabla 35. ANOVA para la linealidad del sistema (hidrocortisona).

Dietamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , $F_{calc}(reg)$ y $F_{calc}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del sistema.

CLOANFENICOL

% Adicionado	mg Adicionados	mg Recuperados	Resultados	Crit. de aceptación
80	10.0	10.2004	$Cv = 0.0302 \%$ $r^2 = 0.9999$ $b = 0.4890$	$< 1.5 \%$ > 0.99 $= 0.0$
90	11.25	11.4310		
100	12.5	12.7799		
110	13.75	14.0497		
120	15.0	15.1022		

IC para la ordenada al origen: 0.06469 a 0.9070

$t_{calc} = 2.4939$

$t_{crit} = 2.1004$

Tabla 36. Evaluación de la linealidad del sistema para cloranfenicol

Fuente de variación	F_{calc}	F_{crit}	Crit. de aceptación
Regresión	4026.8930	4.97	$F_{calc}(reg) \geq F_{crit}(reg)$
Falta de ajuste	3.01487	3.71	$F_{calc}(fa) \leq F_{crit}(fa)$

Tabla 37. ANOVA para la linealidad del sistema (cloranfenicol).

Dietamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , $F_{calc}(reg)$ y $F_{calc}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del sistema.

BENZOCAINA

% Adicionado	mg Adicionados	mg Recuperados	Resultados	Crit. de aceptación
80	8.0	7.9915	$Cv = 0.0042 \%$ $r^2 = 0.9999$ $b = -0.1317$	$< 1.5 \%$ > 0.99 $= 0.0$
90	9.0	9.9367		
100	10.	10.1099		
110	11.0	11.0295		
120	12.0	12.0071		

IC para la ordenada al origen: -0.4764 a 0.2129

$t_{calc} = -0.8257$

$t_{crit} = 2.1004$

Tabla 38. Evaluación de la linealidad del sistema para benzocaina

Fuente de variación	F _{cal}	F _{tab}	Crit. de aceptación
Regresión	4123.6799	4.67	F _{cal(reg)} ≥ F _{tab(reg)}
Falta de ajuste	2.0023	3.71	F _{cal(fa)} ≤ F _{tab(fa)}

Tabla 39. ANOVA para la linealidad del sistema (benzocaina).

Dietamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , F_{cal(reg)} y F_{cal(fa)} cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del sistema.

Las gráficas correspondientes a la linealidad del sistema se representan en las fig. 6.5, 6.6 y 6.7.

c) EXACTITUD DEL MÉTODO

HIDROCORTISONA % Recuperado	CLORANPENICOL % Recuperado	BENZOCAINA % Recuperado
101.17	99.00	99.44
101.00	99.23	99.43
100.54	99.93	99.04
101.48	99.99	99.93
100.57	99.08	99.75
101.05	99.99	99.45
X = 100.99% CV = 0.3484%	X = 99.39% CV = 0.3823%	X = 99.34% CV = 0.4088%

Criterio de aceptación: promedio de recobro 97 - 103 %; CV ≤ 3 %

Tabla 40. Valores obtenidos en la evaluación de la exactitud del método para hidrocortisona, cloranfenicol y benzocaina

Dietamen: el método es exacto para los tres fármacos ya que los promedios de recobro se encuentran dentro del intervalo establecido para métodos espectrofotométricos y el CV < 3 %.

4) LINEALIDAD DEL MÉTODO

Los datos enlistados son el promedio de 3 determinaciones para cada punto y los intervalos de confianza fueron estimados con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

HIDROCORTISONA

mg Adicionado	mg Recuperados	% Recobro	Resultados	Crit. de aceptación
4.0	4.0421	101.05	%R = 101.05	97 - 103 %
4.5	4.5057	100.15	m = 1.0263	= 1.0
5.0	5.0047	101.29	b = -0.0725	= 0.0
5.5	5.5009	101.78	r ² = 0.9979	> 0.99
6.0	6.0004	101.01		

IC para la ordenada al origen: -0.2138 a 0.0087

IC para la pendiente : 0.9974 a 1.0533

tsaic(m) = 1.6509 ; tsaic(b) = -1.1097

tscrit = 2.1604

Tabla 41. Evaluación de la linealidad del método para hidrocortisona.

Fuente de variación	Fca	Fcb	Crit. de aceptación
Regresión	6273.2836	4.67	Fca(reg) ≥ Fcb(reg)
Falta de ajuste	3.4398	3.71	Fca(fa) ≤ Fcb(fa)

Tabla 42. ANOVA para la linealidad método (hidrocortisona)

Diágnosis: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r², la media aritmética del %R, Fca(reg) y Fca(fa) cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

CLORANFENICOL

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro	Resultados	Crit. de aceptación
10.0	10.0142	100.14	%R = 99.27	97 - 103 %
11.25	11.1124	99.75	m = 1.0099	= 1.0
12.5	12.5162	100.08	b = -0.1027	= 0.0
13.75	13.7993	100.34	r ² = 0.9979	> 0.99
15.0	14.9932	99.75		

IC para la ordenada al origen: -0.5722 a 0.3689

IC para la pendiente : 0.9994 a 1.0437

tsaic(m) = 0.3809 ; tsaic(b) = -0.4726

tscrit = 2.1604

Tabla 43. Evaluación de la linealidad del método para cloranfenicol.

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	3418.9087	4.67	Fcal(reg) \geq Fcrit(reg)
Falta de ajuste	1.8491	3.71	Fcal(fa) \leq Fcrit(fa)

Tabla 44. ANOVA para la linealidad método (cloranfenicol)

Dicetamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , la media aritmética del %R, Fcal(reg) y Fcal(fa) cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

BENZOCANA

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro	Resultados	Crit. de aceptación
8.0	7.8330	98.16	%R = 99.27	97 - 103 %
9.0	8.8948	98.82	m = 1.0057	= 1.0
10.0	9.9642	99.64	b = -0.1270	= 0.0
11.0	11.0110	100.10	$r^2 = 0.9979$	> 0.99
12.0	11.8994	99.07		

IC para la ordenada al origen: -0.4076 a 0.1536

IC para la pendiente : 0.9779 a 1.0336

tsal(m) = 1.0057 ; tsal(b) = -0.1270

tsrit = 2.1604

Tabla 45. Evaluación de la linealidad del método para benzocaina

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	8114.9842	4.67	Fcal(reg) \geq Fcrit(reg)
Falta de ajuste	2.8348	3.71	Fcal(fa) \leq Fcrit(fa)

Tabla 46. ANOVA para la linealidad método (benzocaina)

Dicetamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , la media aritmética del %R, Fcal(reg) y Fcal(fa) cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

Las gráficas correspondientes a la linealidad del método se representan en las fig. 6.8, 6.9 y 6.10

e) PRECISIÓN DEL MÉTODO

HIDROCORTISONA		
ANALISTA		
DIA	1	2
1	101.17	101.05
	101.00	101.21
	101.45	101.47
2	101.83	101.83
	101.36	101.00
	101.41	101.90

$Cv_{total} = 0.3003$

Tabla 47. Evaluación de la repetibilidad del método para hidrocortisona

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Analista	0.0002	18.51	$Fcal(anal) \leq Fcrit(anal)$
Día	1.4849	4.46	$Fcal(día) \leq Fcrit(día)$

Tabla 48. ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (hidrocortisona)

Dictamen: El método es repetible ya que el Cv_{total} es menor al 3 % y como $Fcal(anal)$ y $Fcal(día)$ son menores a sus $Fcrit$ correspondientes, el método analítico es reproducible por los analistas en distintos días por un mismo analista.

CLORANFENICOL		
ANALISTA		
DIA	1	2
1	99.80	99.59
	99.23	99.01
	99.93	100.83
2	100.04	99.88
	99.45	99.57
	99.84	100.43

$Cv_{total} = 0.5007$

Tabla 49. Evaluación de la repetibilidad del método para cloranfenicol

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Analista	2.8222	18.51	$F_{cal}(anal) \leq F_{crit}(anal)$
Día	0.1388	4.46	$F_{cal}(día) \leq F_{crit}(día)$

Tabla 60. ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (cloranfenicol)

Dicotamen: El método es repetible ya que el Cv_{total} es menor al 3 % y como $F_{cal}(anal)$ y $F_{cal}(día)$ son menores a sus F_{crit} correspondientes, el método analítico es reproducible por los analistas en distintos días por un mismo analista.

BENZOCAINA

ANALISTA		
DIA	1	2
1	99.44	99.45
	99.43	99.52
	99.53	99.59
2	99.66	99.55
	99.48	99.39
	99.64	99.61

$$Cv_{total} = 0.0887$$

Tabla 61. Evaluación de la repetibilidad del método para benzocaina

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Analista	0.0339	18.51	$F_{cal}(anal) \leq F_{crit}(anal)$
Día	1.5741	4.46	$F_{cal}(día) \leq F_{crit}(día)$

Tabla 62. ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (benzocaina)

Dicotamen: El método es repetible ya que el Cv_{total} es menor al 3 % y como $F_{cal}(anal)$ y $F_{cal}(día)$ son menores a sus F_{crit} correspondientes, el método analítico es reproducible por los analistas en distintos días por un mismo analista.

g) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

Resultado: $\%R(\bar{x}_3) = 99.1 \%$ para hidrocortisona
 = 98.4 % para cloranfenicol
 = 98.2 % para benzocaína

Criterio de aceptación: $\%R = 97 - 103 \%$

Diotamen: La muestra analítica fue estable a temperatura ambiente por lo menos durante 24 horas después de su preparación ya que el valor promedio del $\%R$ se encuentra entre 97 y 103 %.

TABLA 53. RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DE LA FORMULACIÓN 9.

PRECISIÓN DEL SISTEMA	LINEALIDAD DEL SISTEMA		EXACTITUD DEL MÉTODO	LINEALIDAD DEL MÉTODO		PRECISIÓN DEL MÉTODO
HIDROCORTISONA						
X = 100.22 % DE= 0.4037 CV= 0.4028	m= 1.0069 IC= 0.9777 a 1.0421 $t_{cal} = 67.8007$ b= 0.0042 IC= -0.1583 a -0.1667 $t_{cal} = 0.0558$ $r^2 = 0.9971$	Fcal(Reg)= 4596.94 Fcal(FA)= 2.2734	X = 100.86 % DE= 0.3528 CV= 0.3494 IC= 100.56 a 101.33 %	m = 1.0253 IC= 0.9973 a 1.0533 $t_{cal} = 1.9569$ b= -0.0725 IC= -0.2137 a 0.0886 $t_{cal} = -1.1086$ $r^2 = 0.9979$	Fcal(Reg)= 6273.29 Fcal(FA)= 3.4355	Fcal(Anal)= 0.0062 Fcal(A/D)= 1.4646 CVtot= 0.3003
CLORANFENICOL						
X = 101.40 % DE= 0.8814 CV= 0.8692	m= 0.9795 IC= 0.9661 a 1.0128 $t_{cal} = 53.4561$ b= 0.4880 IC= 0.0846 a 0.9070 $t_{cal} = 2.4936$ $r^2 = 0.9867$	Fcal(Reg)= 4026.68 Fcal(FA)= 3.01486	X = 99.39 % DE= 0.3799 CV= 0.3823 IC= 98.99 a 99.79 %	m = 1.0065 IC= 0.9893 a 1.0437 $t_{cal} = 0.3809$ b= -0.1027 IC= -0.5722 a 0.3668 $t_{cal} = -0.4726$ $r^2 = 0.9862$	Fcal(Reg)= 3418.60 Fcal(FA)= 1.6491	Fcal(Anal)= 2.8222 Fcal(A/D)= 0.1388 CVtot= 0.5007
BENZOCAINA						
X = 100.22 % DE= 0.5115 CV= 0.5103	m= 1.0144 IC= 0.9803 a 1.0485 $t_{cal} = 64.2156$ b= -0.1317 IC= -0.4764 a 0.2129 $t_{cal} = -0.6257$ $r^2 = 0.9906$	Fcal(Reg)= 4123.68 Fcal(FA)= 2.6922	X = 99.34 % DE= 0.4041 CV= 0.4068 IC= 98.92 a 99.76 %	m = 1.0057 IC= 0.9779 a 1.0335 $t_{cal} = 0.4452$ b= -0.1270 IC= -0.4078 a 0.1535 $t_{cal} = -0.9779$ $r^2 = 0.9978$	Fcal(Reg)= 6114.99 Fcal(FA)= 2.9349	Fcal(Anal)= 0.0339 Fcal(A/D)= 1.5741 CVtot= 0.0057
VALORES DE TABLAS	$t_{crit} = 2.1604$	Fcrit(Reg)= 4.67 Fcrit(FA)= 3.71		$t_{crit} = 2.1604$	Fcrit(Reg)= 4.67 Fcrit(FA)= 3.71	Fcrit(Anal)= 18.51 Fcrit(A/D)= 4.46

6.2.3. FORMULACIÓN 10

a) PRECISIÓN DEL SISTEMA

SULFAMETOXAZOL % Recuperado	TRIMETOPRIM % Recuperado
99.78	99.56
99.96	99.85
99.90	99.55
99.90	99.21
100.23	100.02
100.45	99.73
X = 100.02 % CV = 0.2848 %	X = 99.85 % CV = 0.2901 %

Criterio de Aceptación: $CV \leq 1.5 \%$

Tabla 54. Valores obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema de medición para sulfametoxazol y trimetoprim.

Dicémen: el sistema es preciso para ambos fármacos ya que los CV correspondientes son menores a 1.5 %.

b) LINEALIDAD DEL SISTEMA

Los datos enlistados son el promedio de tres determinaciones para cada punto y los intervalos de confianza fueron estimados con un nivel de confianza del $\alpha=0.05$

SULFAMETOXAZOL

% Adicionado	mg Adicionados	mg Recuperados	Resultados	Crit. de aceptación
80	32	31.5129	CV = 0.0076 % $r^2 = 0.9982$ b = -1.3249	< 1.5 %
90	36	35.8442		> 0.98
100	40	39.9782		= 0.0
110	44	43.9782		
120	48	47.9908		

IC para la ordenada al origen: -2.3618 a -0.2680

ICalc = -2.7082

ICrit = 2.1604

Tabla 55. Evaluación de la linealidad del sistema para sulfametoxazol.

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	7188.3485	4.67	Fcal(reg) \geq Fcrit(reg)
Falta de ajuste	0.2637	3.71	Fcal(fa) \leq Fcrit(fa)

Tabla 56. ANOVA para la linealidad del sistema (sulfametoxazol).

Dictamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , $F_{cal}(reg)$ y $F_{cal}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del sistema.

TRIMETOPRIM

% Adicionado	mg Adicionados	mg Recuperados	Resultados	Crit. de aceptación
80	8.4	8.3977	CV = 0.7015 % $r^2 = 0.9979$ b = 0.02614	< 1.5 % > 0.98 = 0.0
90	7.2	7.2116		
100	8.0	8.0029		
110	8.8	8.8459		
120	9.6	9.5705		

IC para la ordenada al origen: -0.1876 a 0.2499
tcalc = 0.2524 tcrit = 2.1804

Tabla 57. Evaluación de la linealidad del sistema para trimetoprim.

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	6058.4879	4.67	$F_{cal}(reg) \geq F_{crit}(reg)$
Falta de ajuste	0.8088	3.71	$F_{cal}(fa) \leq F_{crit}(fa)$

Tabla 58. ANOVA para la linealidad del sistema (trimetoprim).

Dictamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r^2 , $F_{cal}(reg)$ y $F_{cal}(fa)$ cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del sistema.

Las gráficas correspondientes a la linealidad del sistema se representan en las fig. 6.11 y 6.12

c) EXACTITUD DEL MÉTODO

SULFAMETOXAZOL % Recuperado	TRIMETOPRIM % Recuperado
100.62	99.21
101.13	99.79
101.08	99.88
100.29	100.66
99.71	99.55
100.24	99.90
X = 100.34 % CV = 0.8623 %	X = 99.30 % CV = 0.9125 %

Criterio de aceptación: promedio de recobro 97 - 103 %; CV ≤ 3 %

Tabla 59. Valores obtenidos en la evaluación de la exactitud del método para sulfametoxazol y trimetoprim.

Dictamen: el método es exacto para ambos fármacos ya que los promedios de recobro se encuentran dentro del intervalo establecido para métodos espectrofotométricos y el CV < 3 %.

d) LINEALIDAD DEL MÉTODO

SULFAMETOXAZOL

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	Resultados	Crit. de aceptación
32	32.1128	100.35	%R = 100.5	97 - 103 %
36	36.9189	99.77	m = 1.0387	= 1.0
40	40.1680	100.40	b = -1.3485	= 0.0
44	44.2768	100.63	r ² = 0.9968	> 0.99
48	48.7213	101.52		

IC para la ordenada al origen: -2.7559 a 0.0769

IC para la pendiente : 1.0044 a 1.0750

tcalc(m) = 2.4303 ; tcalc(b) = -2.0439

tcrit = 2.1604

Tabla 60. Evaluación de la linealidad del método para sulfametoxazol.

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Regresión	4048.9768	4.67	Fcal(reg) ≥ Fcrit(reg)
Falta de ajuste	0.8446	3.71	Fcal(fa) ≤ Fcrit(fa)

Tabla 61. ANOVA para la linealidad método (sulfametoxazol)

Dictamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r², la media aritmética del %R, Fcal(reg) y Fcal(fa) cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

TRIMETOPRIM

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro	Resultados	Crit. de aceptación
6.4	6.4215	100.34	%R = 100.2	97 - 103 %
7.2	7.1928	99.90	m = 1.0099	= 1.0
8.0	8.0171	100.21	b = -0.0597	= 0.0
8.8	8.8144	100.16	r ² = 0.9991	> 0.99
9.6	9.6501	100.52		

IC para la ordenada al origen: -0.5730 a 0.4536

IC para la pendiente : 0.9463 a 1.0734

t_{calc}(m) = 0.3351 ; t_{calc}(b) = -0.2512

t_{crit} = 2.1604

Tabla 62. Evaluación de la linealidad del método para trimetoprim

Fuente de variación	F _{cal}	F _{crit}	Crit. de aceptación
Regresión	1179.4335	4.67	F _{cal} (reg) ≥ F _{crit} (reg)
Falta de ajuste	0.04998	3.71	F _{cal} (fa) ≤ F _{crit} (fa)

Tabla 63. ANOVA para la linealidad método (trimetoprim)

Dictamen: Existe relación altamente significativa de mg adicionados - mg recuperados y el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado, ya que el CV, r², la media aritmética del %R, F_{cal}(reg) y F_{cal}(fa) cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

Las gráficas correspondientes a la linealidad del método se representan en las fig. 6.13 y 6.14.

e) PRECISIÓN DEL MÉTODO

SULFAMETOXAZOL

DIA	ANALISTA	
	1	2
1	99.28	99.55
	100.61	100.84
	100.92	100.75
2	99.38	99.17
	99.31	99.14
	99.35	99.42

CV_{total} = 1.0371

Tabla 64. Evaluación de la repetibilidad del método para sulfametoxazol

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Analista	2.0838	18.51	$F_{cal}(anal) \leq F_{crit}(anal)$
Día	0.0991	4.46	$F_{cal}(día) \leq F_{crit}(día)$

Tabla 66. ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (sulfametoxazol)

Dictamen: El método es repetible ya que el Cv_{total} es menor al 3 % y como $F_{cal}(anal)$ y $F_{cal}(día)$ son menores a sus F_{crit} correspondientes, el método analítico es reproducible por los analistas en distintos días por un mismo analista.

TRIMETOPRIM

ANALISTA		
DIA	1	2
1	101.36	100.19
	101.29	102.03
	100.81	102.17
2	102.19	102.04
	102.13	101.84
	100.98	102.19

$Cv_{total} = 0.6792$

Tabla 66. Evaluación de la repetibilidad del método para trimetoprim

Fuente de variación	Fcal	Fcrit	Crit. de aceptación
Analista	0.5163	18.51	$F_{cal}(anal) \leq F_{crit}(anal)$
Día	1.2365	4.46	$F_{cal}(día) \leq F_{crit}(día)$

Tabla 67. ANOVA para la determinación de la reproducibilidad del método (trimetoprim)

Dictamen: El método es repetible ya que el Cv_{total} es menor al 3 % y como $F_{cal}(anal)$ y $F_{cal}(día)$ son menores a sus F_{crit} correspondientes, el método analítico es reproducible por los analistas en distintos días por un mismo analista.

7) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

Resultado: $\%R(\bar{x}_3) = 101.6 \%$ para sulfametoxazol
 $= 99.8 \%$ para trimetoprim

Criterio de aceptación: $\%R = 97 - 103 \%$

Dictamen: La muestra analítica fue estable a temperatura ambiente por lo menos durante 24 horas después de su preparación ya que el valor promedio del $\%R$ se encuentra entre 97 y 103 %.

TABLA 66 RESUMEN DE LA VALIDACION DE LA FORMULACIÓN 10

PRECISION DEL SISTEMA	LINEALIDAD DEL SISTEMA	EXACTITUD DEL MÉTODO	LINEALIDAD DEL MÉTODO	PRECISION DEL MÉTODO
SULFAMETOXAZOL				
X = 100.02 % DE= 0.2849 CV 0.2848	m = 1.0267 IC= 1.0008 a 1.0529 t_{cal} = 84.7841 b = -1.3248 IC= -2.9818 a -0.2680 t_{cal} = -2.7082 r^2 = 0.9982	F _{cal(Reg)} = 508.01 F _{cal(FA)} = 0.2837	X = 100.35 % DE= 0.8854 CV= 0.8823 IC = 99.42 a 101.27 %	m = 1.0387 IC= 1.0044 a 1.0730 t_{cal} = 2.4303 b = -1.3485 IC= -2.7759 a 0.0789 t_{cal} = -2.9439 r^2 = 0.9988
				F _{cal(Anal)} = 0.8804 F _{cal(AD)} = 1.5152 CV _{rel} = 1.0371
TRIMETOPRIM				
X = 99.95 % DE= 0.2791 CV= 0.2801	m = 1.0274 IC= 0.9953 a 1.0598 t_{cal} = 89.0405 b = -0.0988 IC= -0.3907 a 0.1988 t_{cal} = -0.7383 r^2 = 0.9973	F _{cal(Reg)} = 4786.80 F _{cal(FA)} = 0.9823	X = 99.30 % DE= 0.9081 CV= 0.9121 IC = 98.35 a 100.25 %	m = 1.0089 IC= 0.9483 a 1.0734 t_{cal} = 0.3351 b = -0.0987 IC= -0.5730 a 0.4538 t_{cal} = -0.2512 r^2 = 0.9991
VALORES DE TABLAS	t_{crit} = 2.1804	F _{crit(Reg)} = 4.67 F _{crit(FA)} = 3.71		t_{crit} = 2.1804 F _{crit(Reg)} = 4.67 F _{crit(FA)} = 3.71
				F _{crit(Anal)} = 18.51 F _{crit(AD)} = 4.46

6.3. EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS VALIDADOS.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de dos lotes diferentes de cada formulación con los métodos validados. Se realizaron doce repeticiones por lote y la comparación entre éstos se representa mediante gráfico de barras en la figura correspondiente.

Formulación 8:

Espironolactona		Furosemida	
Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
% R = 101.19	97.94	104.10	100.34
D.E. = 0.8297	0.8790	0.7319	1.0987
C.V. = 0.8199	0.8976	0.7031	1.0929

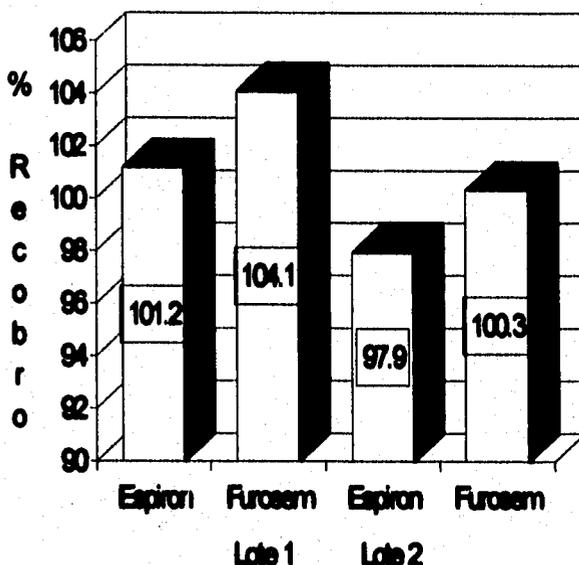


Figura 5. Comparación de dos lotes para la cuantificación de Espironolactona/Furosemida en cápsulas.

Formulación 9:

Hidrocortisona		Cloranfenicol		Benzocaína	
Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
% R = 93.75	94.05	99.81	99.40	97.99	97.08
C.V. = 0.5869	0.5250	0.8255	0.9546	0.5059	0.4164
D.E. = 0.6261	0.5584	0.8271	0.9599	0.5780	0.4290

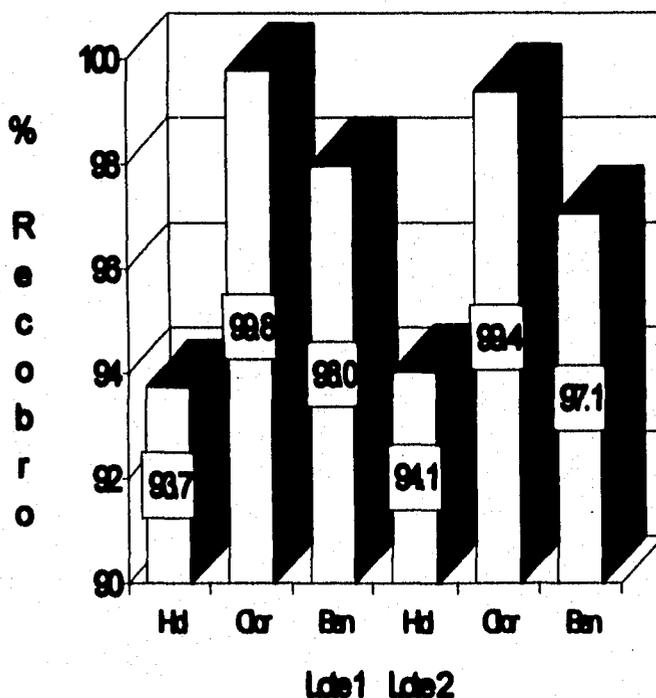


Figura 6. Comparación de dos lotes para la cuantificación de Hidrocortisona/ Cloranfenicol/ Benzocaína en solución óptica.

Formulación 10:

Sulfametoxazol		Trimetoprim	
Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
% R = 94.42	97.04	100.06	96.69
D.E. = 0.6037	0.5006	0.9692	0.5667
C.V. = 0.6394	0.5159	0.9577	0.5661

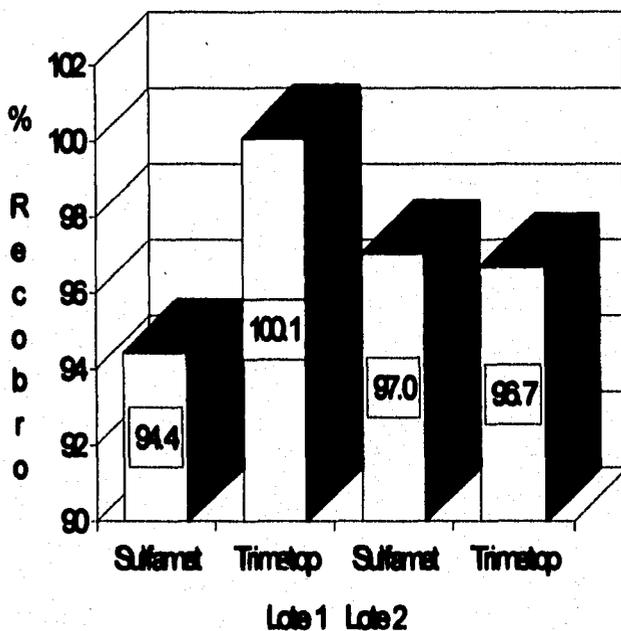


Figura 7. Comparación de dos lotes para la cuantificación de Sulfametoxazol/Trimetoprim en tabletas

7.0. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En la primera etapa de estudio, se evaluó la forma de calibración del sistema para la cuantificación de fármacos en una mezcla considerada como problema.

Como se puede observar en los cuadros de preparación de soluciones de referencia del punto 5.4.2., en una misma solución de referencia, los fármacos involucrados no deben estar presentes al mismo nivel de concentración, es decir, todos los fármacos no podrán estar presentes ya sea al 90, 100 o 110% de su concentración en la misma solución, sino que deberán mezclarse a concentraciones bajas, medias y altas, esto debido a que el software al establecer el sistema de ecuaciones matriciales para la calibración debe cumplir el principio matemático de no generar matrices nulas que impidan la solución del sistema en general (14,15); por otra parte, un intervalo de longitud de onda bien establecido (donde el espectro de la mezcla de fármacos presenta máximos y mínimos definidos) aumenta la precisión y exactitud del método sobre todo en sistemas en donde hay superposición de espectros, ya que el método de multicomponentes al estar basado en la medida de las contribuciones de absorbancia de un compuesto, optimiza la calibración del sistema en un intervalo de longitud de onda donde todas las especies siempre estén presentes y además dentro de la Linealidad de la Ley de Beer⁽⁹⁾.

El intervalo de concentraciones juega un papel importante, ya que en una calibración donde se involucran concentraciones lo más cercano posible al valor real esperado, da como resultado minimización de errores de cálculo en las soluciones problema. En este caso en particular, donde se estudiaron productos farmacéuticos, el intervalo de concentración donde se evalúan la mayoría de éstos está entre 90-110% (según lo establecido por Farmacopea Nacional).

Bajo las condiciones anteriores se observó que el número de combinaciones posibles para la preparación de una solución de referencia está en función del número de fármacos involucrados y de los niveles de concentración a emplear (al aumentar el núm. de fármacos y niveles de concentración el núm. de soluciones de referencia también aumenta) y además el núm. de arreglos posibles de las soluciones de referencia para la calibración del sistema está en función del núm. disponibles de éstas. Lo más importante es emplear un núm. de soluciones de referencia igual o mayor al núm. de fármacos presentes con la finalidad de generar las ecuaciones independientes necesarias para encontrar la solución única que da como resultado n concentraciones desconocidas.

⁽⁹⁾ Perkin Elmer establece que hay linealidad en un intervalo de Absorbancia de 0.2-1.6 uA.(15)

Los casos que se mencionan a continuación arrojaron valores de cuantificación más aceptables cuando fueron evaluados en el modo de absorbancia, ya que en primera y segunda derivada presentaron errores de cuantificación muy grandes tanto en la mezcla de estándares puros como en la forma farmacéutica (exceptuando las formulaciones 6 y 7 en las cuales se obtuvieron % de recobro en la mezcla de estándares cercanos al 100%), esto se debe a que el espectro de algunos fármacos al ser derivado pierde resolución haciendo que su contribución al espectro total se vea indeterminada y por lo tanto lo hace una limitante para el uso de derivadas en el sistema de multicomponentes.

Como primer punto se observó que fármacos con gran superposición de espectros donde la diferencia entre sus máximos de absorbancia es hasta de 3 nm como lo muestran las formulaciones 1 y 2, no pueden cuantificarse de manera precisa y exacta por lo que se puede inferir que el sistema no es selectivo para alguno de los fármacos presentes ya que su contribución al espectro total no es representativa, es decir, el sistema no es capaz de cuantificar dos o más fármacos con espectros muy semejantes.

En un análisis de multicomponentes para fármacos con gran diferencia de concentración como es el caso de las formulaciones 3 y 4, se observó que el o los compuestos que están presentes en mayor cantidad, son los que más contribuyen al espectro de absorción haciendo despreciables las contribuciones de las otras especies, y favoreciendo la precisión y exactitud en su propia cuantificación. Un análisis de fármacos que presentan gran diferencia de concentraciones y además gran superposición de espectros (formulación 5) confirma las dos posiciones anteriores; en el caso de acetaminofén y cafeína los cuales son los mayores contribuyentes al espectro de Absorbancia (por presentar altas concentraciones y coeficientes de absorptividad grandes), la precisión y exactitud del sistema tiende a dirigirse a éstos. Por otra parte, la contribución de maleato de clorfeniramina y el clorhidrato de fenilefrina se ve nulificado, especialmente en este último, ya que tiene un máximo de absorción casi igual al de cafeína.

Es importante tomar en cuenta que dentro de los requisitos que deben cumplir las mezclas de fármacos para ser cuantificadas mediante el sistema por CEC, está el de conocer todos los componentes de la mezcla que absorben la radiación UV-VIS, ya que de no ser así, se presentan errores de cuantificación; este es el caso que se observa en la formulación 6. En una mezcla de estándares puros de tres componentes donde sus máximos de absorbancia están parcialmente alejados y además no presentan gran diferencia de concentraciones, el sistema tiende a cuantificar con exactitud cada uno de los fármacos presentes. Al analizar la forma farmacéutica, el sistema no fue capaz de cuantificar con exactitud maleato de clorfeniramina y cafeína, ya que probablemente algún excipiente de formulación (colorante o conservador) absorbe en la región donde absorben éstos haciendo que el cálculo de su concentración sea erróneo.

Un caso similar se presenta en la formulación 7, en donde se observó que el placebo absorbe en la región de tiamina, niacinamida y riboflavina, contribuyendo a la absorción total de la mezcla y por lo tanto generando errores de cálculo.

Las condiciones bajo las cuales el sistema cuantificó con precisión una mezcla de fármacos, ya sea una mezcla de estándares o su forma farmacéutica, fue en las formulaciones 8, 9, y 10 donde, la diferencia entre sus concentraciones no es muy grande (menor a 8 veces la concentración mínima de uno de ellos), los máximos de absorbancia presentan diferencias mayores a 6 nm y además los excipientes de formulación no presentan interferencias.

En la formulación 8, la espironolactona presenta su máximo de absorbancia muy cercano a uno de los máximos de la furosemida, pero el sistema presentó selectividad al contar con la absorbancia de dos picos adicionales de este último.

Generalizando, los dos puntos principales que hay que considerar en el análisis de multicomponentes por CEC son: 1) una limitante general viene del hecho de que todos los componentes deben contribuir significativamente a la absorbancia total, lo cual significa que cuando el número de componentes aumenta, sus concentraciones (asumiendo absorktividades molares similares) tendrán que ser del mismo orden de magnitud y 2) las sustancias que presenten gran superposición espectral y además una forma muy similar al de los compuestos de interés, introducirá una limitante adicional al número de componentes que pueden ser cuantificados correctamente.

Además, tomando en cuenta que pequeños cambios en el espectro (debidos a errores por peso, dilución o aforo) podrían dar valores erróneos de concentración, el sistema podría aumentar su eficiencia y disminuir los errores inherentes al método, si existiera un algoritmo dentro del software que permitiera realizar la calibración mediante el uso de varias soluciones de una misma solución de referencia (preparadas de manera independiente) para los diferentes niveles de concentración, obteniéndose de esta forma espectros promediados y no absolutos, y por lo tanto, las pequeñas variaciones espectrales se encontrarían consideradas dentro del ajuste del sistema.

Al evaluar la eficiencia del sistema mediante la validación de las formulaciones 8, 9 y 10, se observó que el sistema es altamente eficiente en los métodos desarrollados, ya que éstos son específicos permitiendo la cuantificación de los fármacos de interés sin interferencias de excipientes comunes de las formas farmacéuticas estudiadas. Las características de linealidad, precisión y exactitud correspondientes a cada formulación, están dentro de lo establecido por las Normas de Validación para métodos espectrofotométricos y al evaluar la robustez de los métodos validados mediante la comparación de dos lotes

diferentes elaborados por un mismo laboratorio, se observó que éstos son capaces de diferenciar cambios inherentes a la formulación, es decir, las diferencias que existen entre lotes elaborados bajo condiciones diferentes. Aún cuando ambos lotes se encontraron dentro de los límites establecidos por Farmacopea Nacional para cada uno de los fármacos involucrados, podría ser necesario efectuar un estudio interlaboratorio para evaluar el comportamiento de los métodos validados cuando éstos se aplican a otros lotes de la misma forma farmacéutica, con la finalidad de obtener la información necesaria que permita realizar las modificaciones pertinentes a cada uno de ellos, y mediante una revalidación establecer que los métodos tienen aplicación universal.

Al extrapolar las limitantes del sistema a las formulaciones presentes actualmente en el mercado nacional, se realizó un diagnóstico de éstas para determinar la utilidad del sistema. Este diagnóstico se realizó mediante comparación bibliográfica de datos de absorción y concentraciones de cada una de las formas farmacéuticas y se encuentran resumidos en el Anexo IV.

Se determinó que la utilidad del sistema en el análisis de productos farmacéuticos (resumido en el cuadro inferior), sería altamente recomendable en el análisis de 33 formulaciones constituyendo un 32.3 % de aplicabilidad al análisis de los polifármacos presentes en el mercado, y en cuyo caso éste resultaría altamente eficiente reduciendo el tiempo y el costo de análisis de dichos productos.

UTILIDAD DEL SISTEMA DE MULTICOMPONENTES EN EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

CASOS EN LOS QUE EL SISTEMA NO FUNCIONA:

-Por diferencia de concentraciones.	46 formulaciones (45.1%)
-Por gran superposición de espectros:	13 formulaciones (12.7%)
-Por diferencia de concentraciones y gran superposición de espectros:	10 formulaciones (9.8%)

CASOS EN LOS QUE EL SISTEMA FUNCIONARIA:

-Formulaciones no evaluadas:	30 formulaciones (29.4%)
-Formulaciones evaluadas:	3 formulaciones (2.9%)

8.0. CONCLUSIONES:

En base a los resultados y su análisis correspondiente, se llegó a las siguientes conclusiones:

1) El empleo del sistema de multicomponentes por CEC se ve limitado a mezclas donde todos los componentes contribuyen a la absorbancia total, no existe gran diferencia en el orden de magnitud de sus concentraciones y no presentan productos de degradación u otras impurezas que impiden la cuantificación de cada uno de ellos.

2) El sistema es altamente eficiente en la cuantificación de mezclas de compuestos que cumplen con las características arriba mencionadas, si se evalúa con las soluciones de referencia convenientes y en un intervalo de longitud de onda bien definido.

3) La aplicabilidad del sistema en el análisis de productos farmacéuticos representa el 33 % de los polifármacos presentes en el mercado nacional.

ANEXO I

Espectros obtenidos en modo de absorbancia, primera y segunda derivada de los fármacos y mezclas de estándares, para cada una de las formulaciones estudiadas.

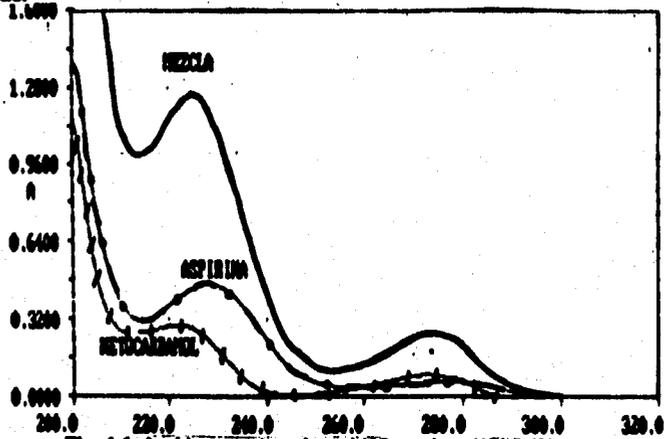


Fig. 1.1. Aspirina y metocarbamol (10 ppm) en HCl 0.1N
Mezcla de fármacos al 100% (ABSORBANCIA)

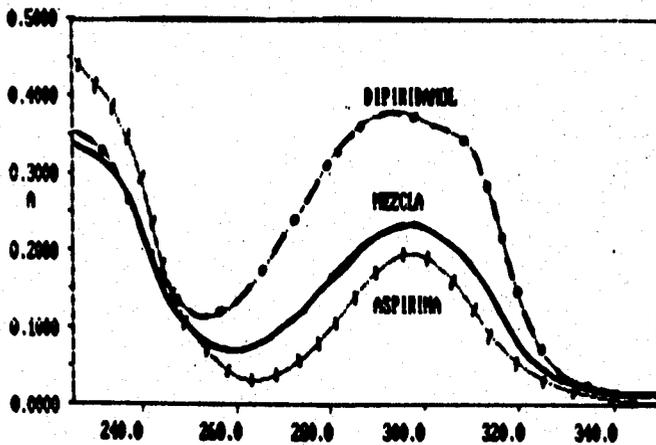


Fig. 2.1. Aspirina y dipiridamol (10 ppm) en NaOH 0.1 N
Mezcla de fármacos al 100% (ABSORBANCIA)

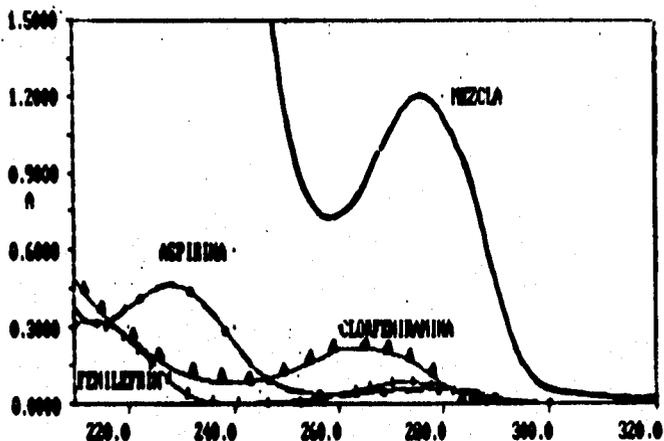


Fig. 3.1. Aspirina, m. de clorfeniramina y c. de fenilefrina (10 ppm) en HCl 0.1N. Mezcla al 100% (ABSORBANCIA)

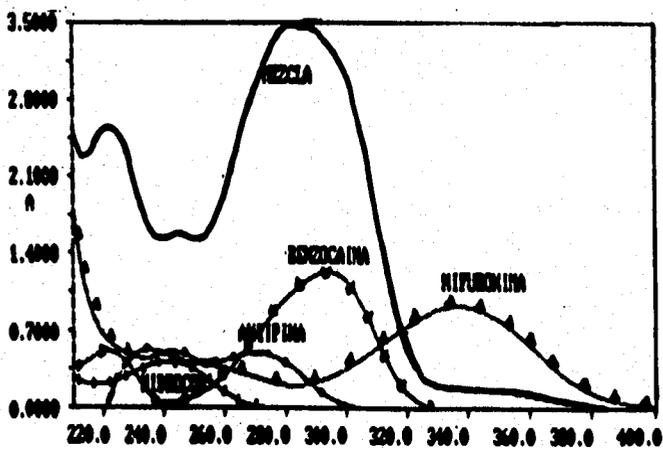


Fig. 4.1. Nifuroxima, hidrocortisona, antipirina y benzocaína en etanol (10 ppm). Mezcla al 100 % (ABSORBANCIA)

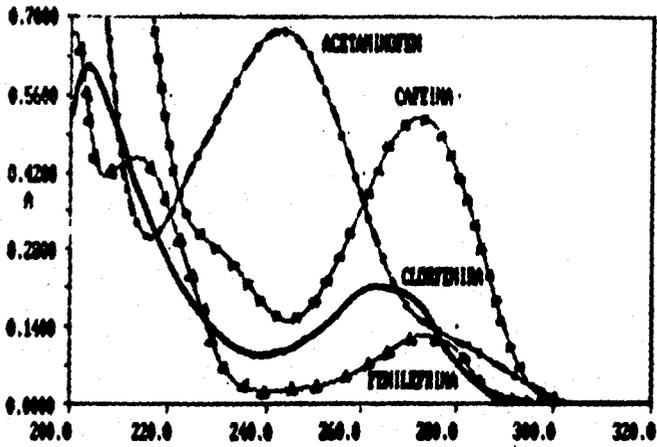


Fig. 6.1. Acetaminofen, cafeina, m. de clorfenirina y c. de fenilefrina en HCl 0.1 N (10 ppm). Mezcla al 100 % (ABSORBANCIA)

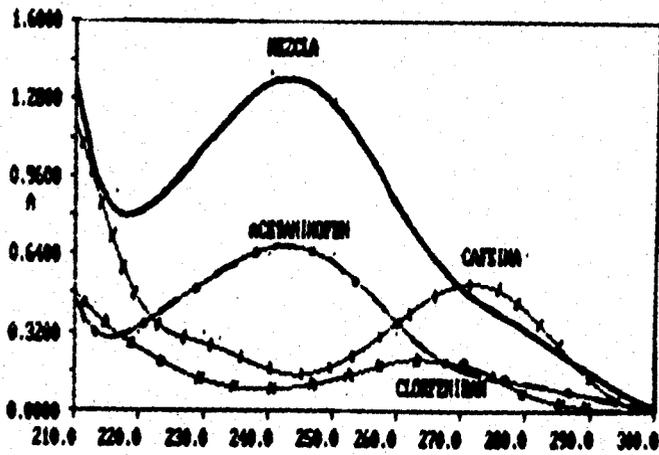


Fig. 6.1. M. de clorfenirina, acetaminofen y cafeina en HCl 0.1 N (10 ppm). Mezcla de fármacos al 100 % (ABSORBANCIA)

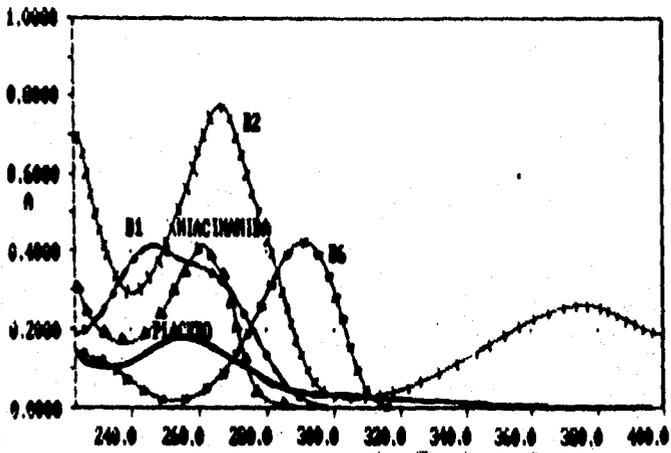


Fig. 7.1. Tiamina, riboflavina, nicotinamida y piridoxina en HCl 0.1 N (10 ppm). Mezcla de fármacos al 100% (ABSORBANCIA)

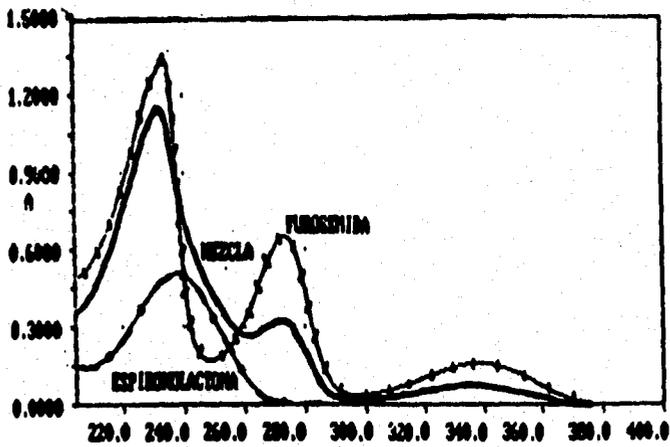


Fig. 8.1. Espironolactona y furosemida en etanol (10 ppm) Mezcla de fármacos al 100 % (ABSORBANCIA)

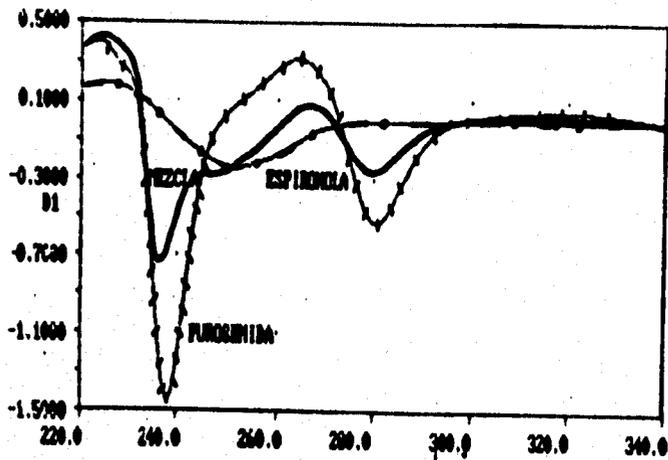


Fig. 8.2. Espironolactona y furosemida (10 ppm) en PRIMERA DERIVADA

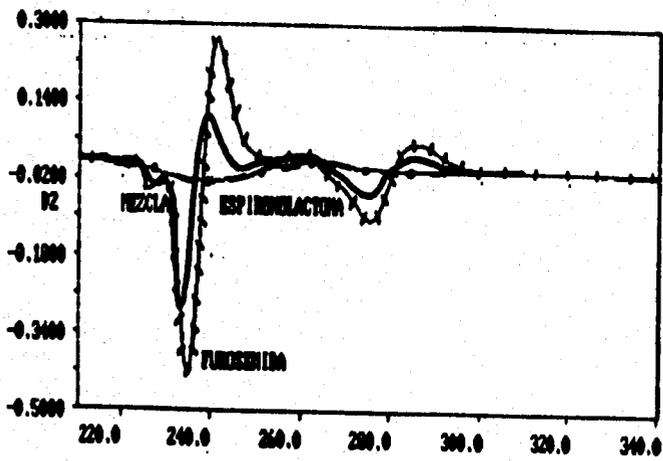


Fig. 8.3. Espironolactona y furosemida (10 ppm) en SEGUNDA DERIVADA

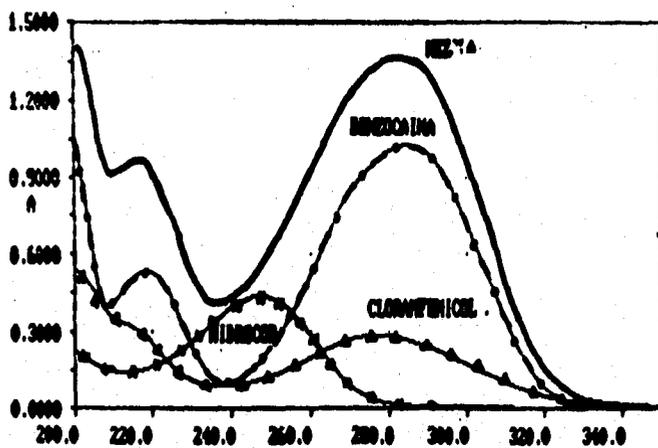


Fig. 0.1. Hidrocortisone, clorfeniracol y benzocaina en agua (10 ppm). Mezcla de fármacos al 100 % (ABSORBANCIA)

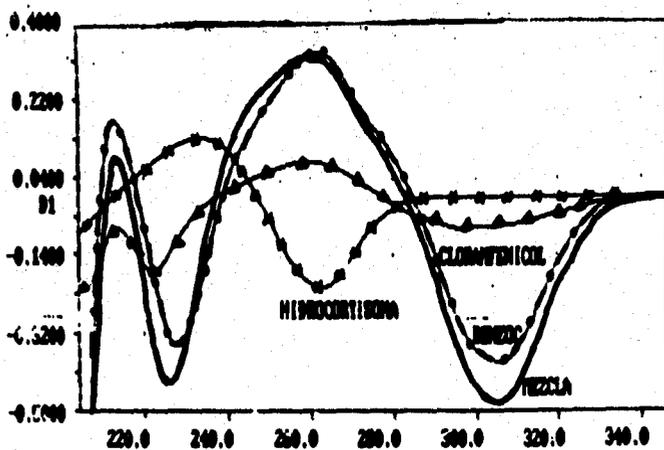


Fig. 0.2. Hidrocortisone, clorfeniracol y benzocaina (10 ppm) PRIMERA DERIVADA

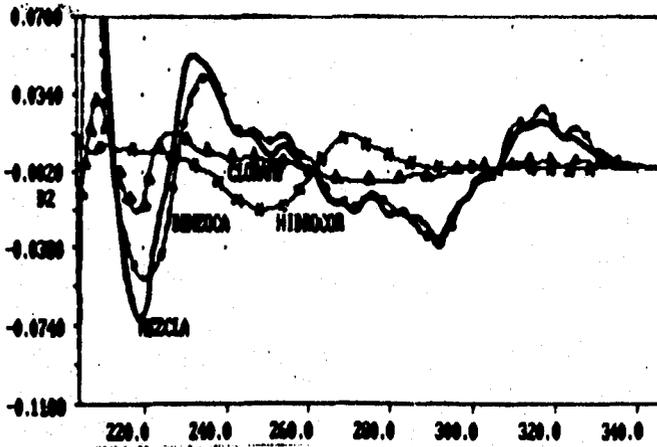


Fig. 9.3. Hidrocortisona, cloranfenicol y benzocaina (10 ppm) en SEGUNDA DERIVADA

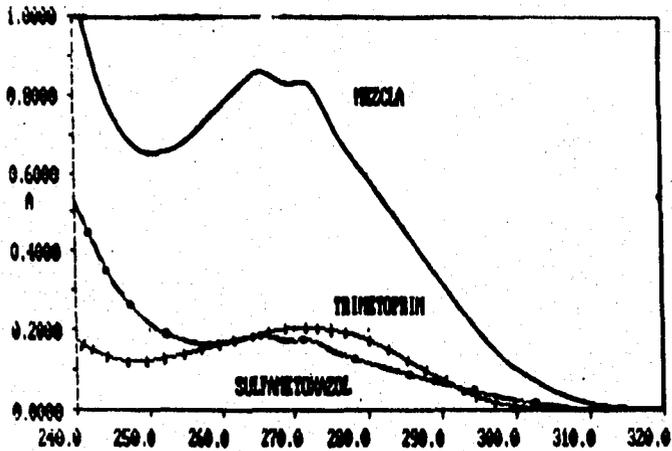


Fig. 10.1. Sulfametoxazol y trimetoprim en HCl 0.1 N (10 ppm)
Mezcla de fármacos al 100 % (ABSORBANCIA)

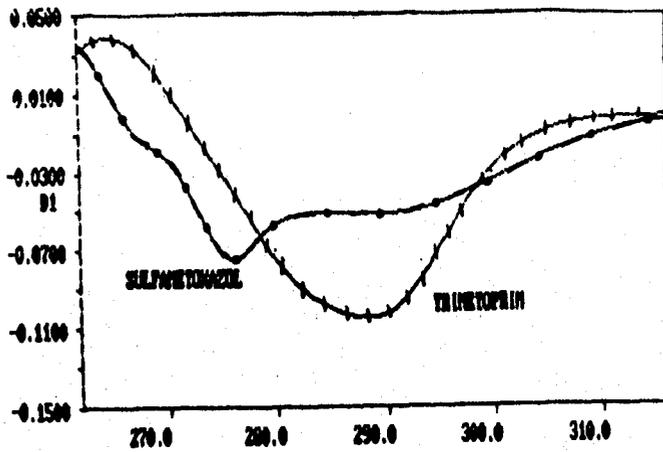


Fig. 10.2. Sulfametoxazol y trimetoprim (10 ppm) en PRIMERA DERIVADA

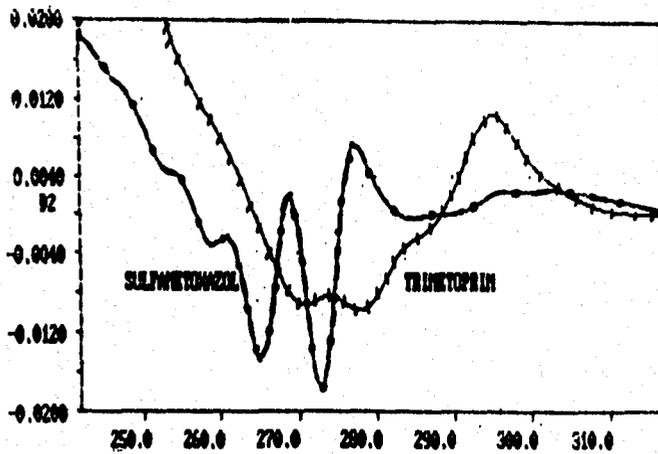


Fig. 10.3. Sulfametoxazol y Trimetoprim (10 ppm) en SEGUNDA DERIVADA

ANEXO II

GRÁFICOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA Y MÉTODO PARA LAS FORMULACIONES VALIDADAS

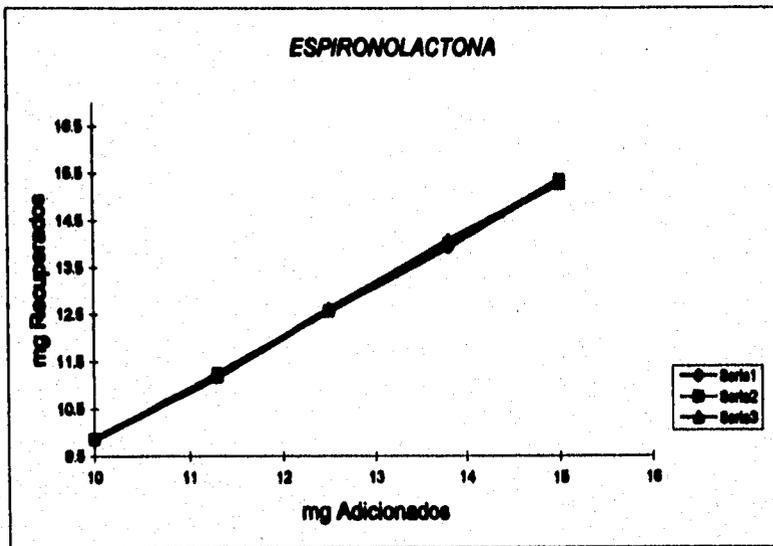


Figura 6.1. Gráfico de linealidad del sistema. $r^2 = 0.9995$, $m = 1.0993$ y $b = -1.1680$

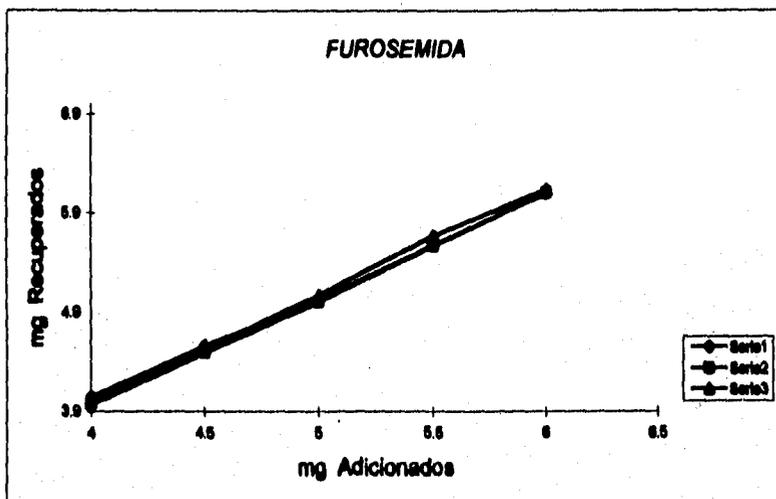


Figura 6.3. Linealidad del sistema. $r^2 = 0.9979$, $m = 1.0612$
y $b = -0.2451$

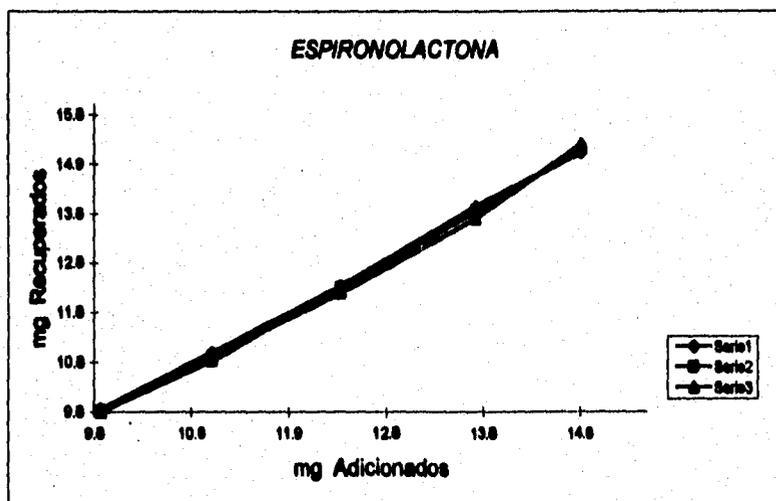


Figura 6.3. Linealidad del método. $r^2 = 0.9973$, $m = 1.0702$
y $b = -0.6258$

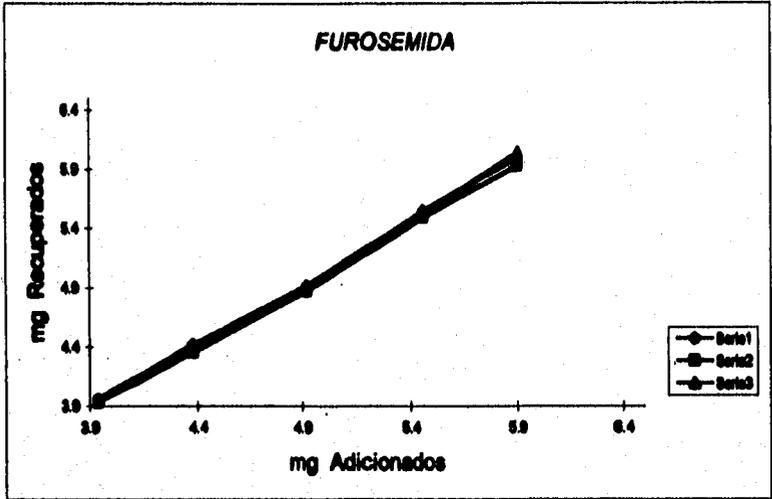


Figura 6.4. Linealidad del método. $r^2 = 0.9974$, $m = 1.0429$ y $b = -0.1791$

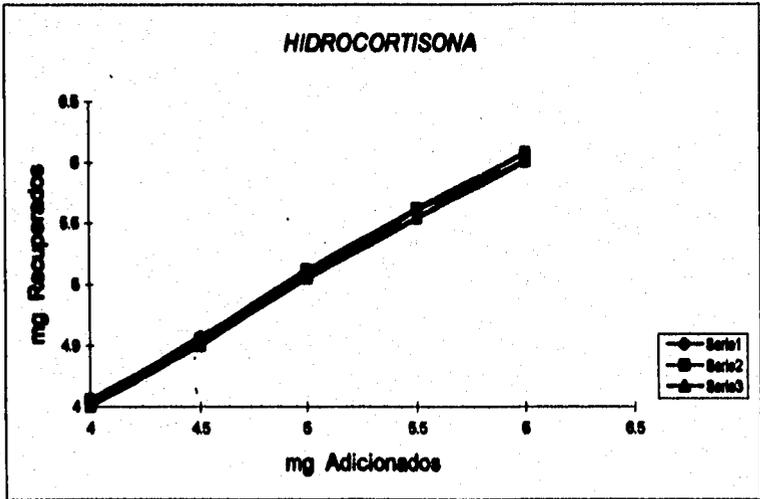


Figura 6.5. Linealidad del sistema. $r^2 = 0.9974$, $m = 1.0099$ y $b = 0.0042$

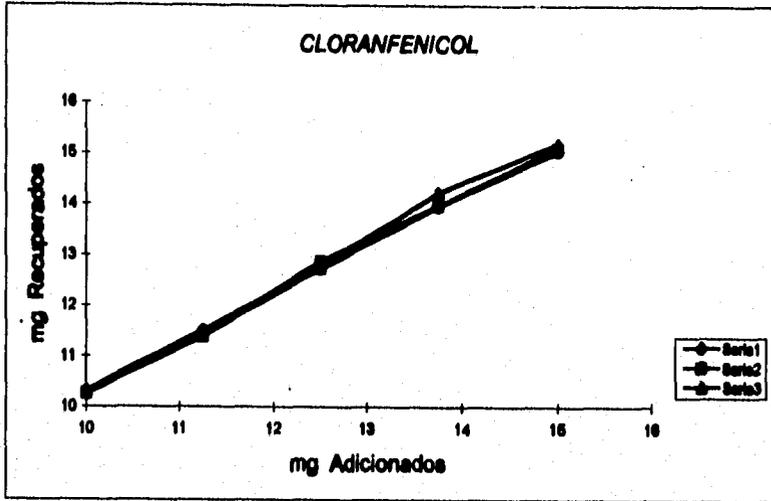


Figura 6.6. Linealidad del sistema. $r^2 = 0.9967$, $m = 0.9795$
y $b = 0.4860$

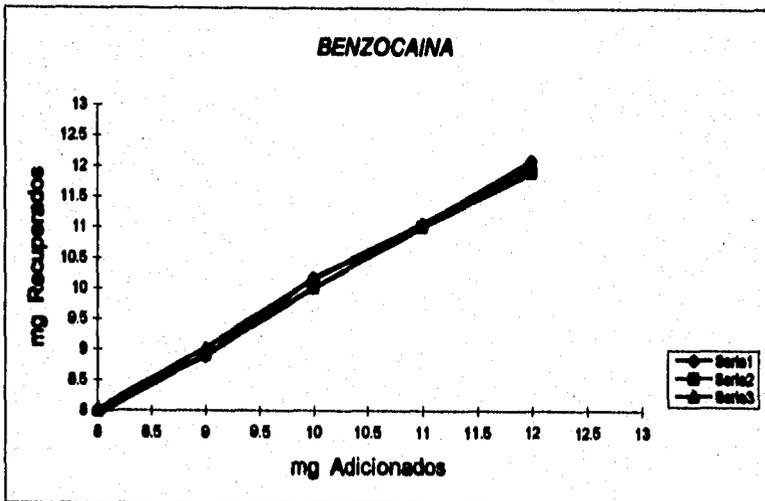


Figura 6.7. Linealidad del sistema $r^2 = 0.9968$, $m = 1.0144$
y $b = -0.1317$

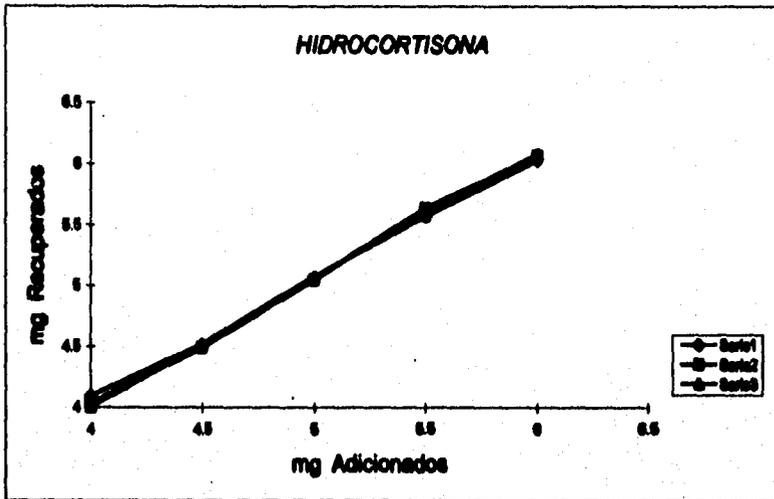


Figura 6.8. Linealidad del método. $r^2 = 0.9979$, $m = 1.0253$
y $b = -0.0725$

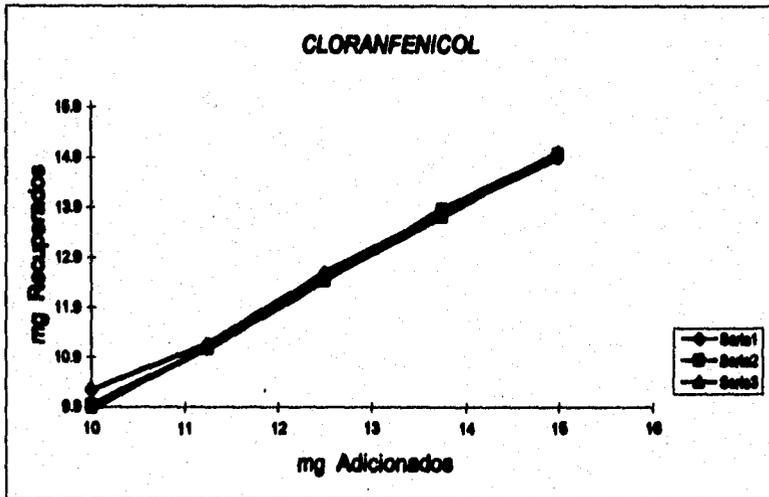


Figura 6.9. Linealidad del método. $r^2 = 0.9979$, $m = 1.0065$
y $b = -0.01027$

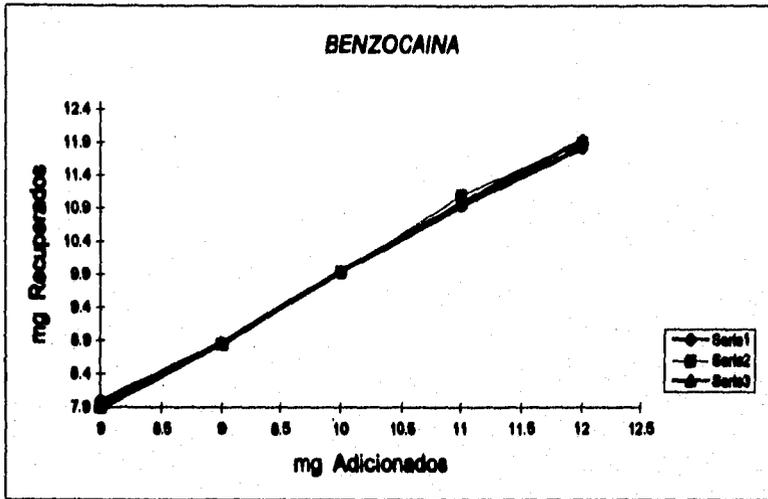


Figura 6.10. Linealidad del método. $r^2 = 0.9978$, $m = 1.0057$ y $b = -0.1270$

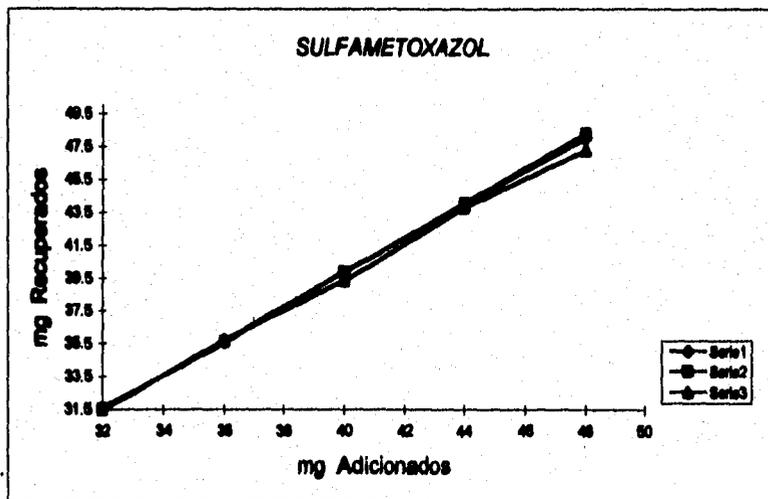


Figura 6.11. Linealidad del sistema. $r^2 = 0.9982$, $m = 1.0267$ y $b = -1.3249$

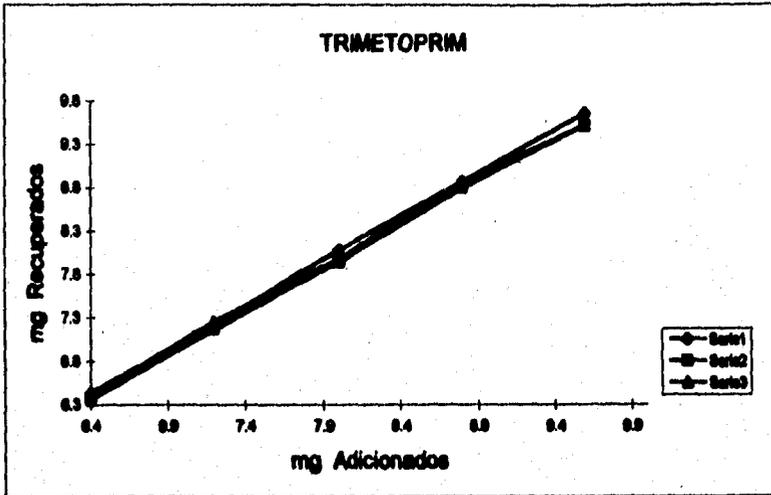


Figura 6.12. Linealidad del sistema. $r^2 = 0.9973$, $m = 1.0274$ y $b = -0.0009$

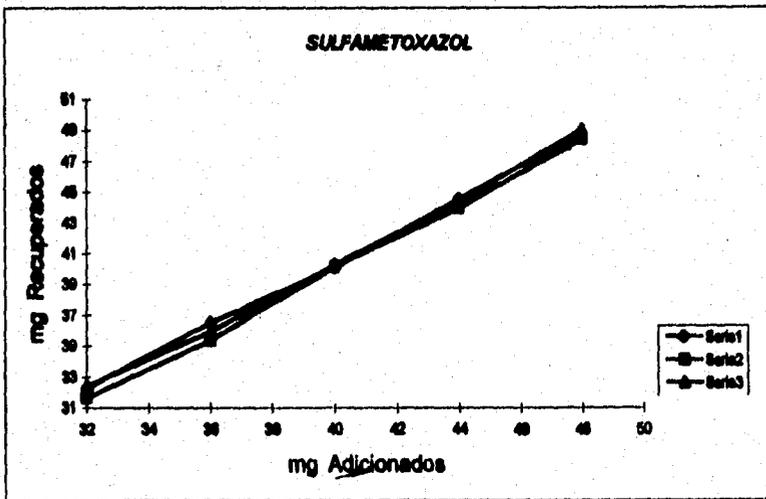


Figura 6.13. Linealidad del método. $r^2 = 0.9968$, $m = 1.0397$ y $b = -1.3495$

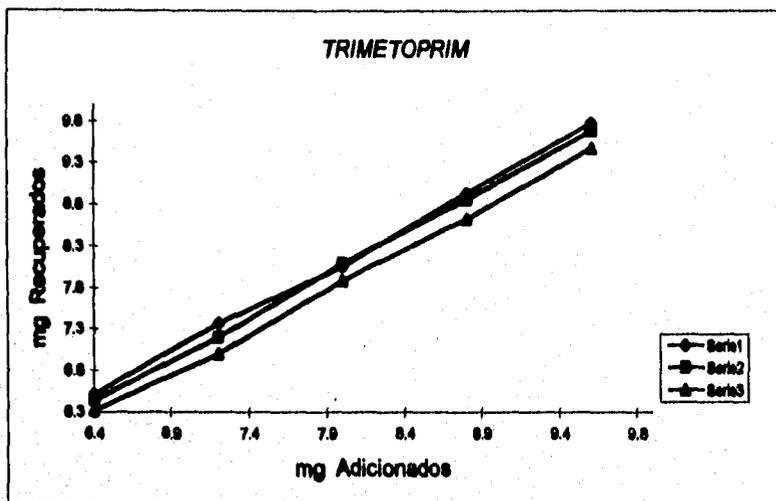


Figura 6.14. Linealidad del método. $r^2 = 0.9891$, $m = 1.0099$
y $b = -0.0597$

ANEXO III

CALCULOS ESTADÍSTICOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

GLOSARIO

y	propiedad medida o cantidad recuperada
n	número de replicaciones
Y	media aritmética
s	desviación estándar
CV	coeficiente de variación
r	coeficiente de correlación
r ²	coeficiente de determinación
Σ	sumatoria
s ²	varianza
DE	desviación estándar
x	cantidad adicionada
t	valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0.975
F	valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada de 0.975
gl	grados de libertad
y...	y total
SC	suma de cuadrados
MC	media de cuadrados
b	pendiente
a	ordenada al origen
R	regresión
ER	error de regresión
FA	falta de ajuste
EP	error puro
ri	No. de replicaciones del iésimo nivel de cantidad adicionada
yi	total de propiedad medida del iésimo nivel de cantidad adicionada
ai	analista
di	día
sk(j)	error del método analítico

1) PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION.

Es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición.

Parámetros:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{n \sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$C.V. = \frac{(s \cdot 100)}{y}$$

2) LINEALIDAD DEL SISTEMA

La relación entre cantidades adicionadas del analito y propiedad medida obtenida, debe ser una función lineal del tipo

$$y_j = \alpha_0 + \beta_0 x_i + E_j(i)$$

donde:

y_j = propiedad medida

α_0 = ordenada al origen

β_0 = pendiente

x_i = cantidades adicionadas del analito

$E_j(i)$ = error del sistema (desviación estándar de regresión - Sy/x -)

$$\beta_0 = b = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \quad ; \quad \alpha_0 = a = \frac{\sum y - b\sum x}{n}$$

$$Sy/x = \sqrt{\frac{\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy}{n-2}} \quad ; \quad CV = \frac{Sy/x \cdot 100}{Y}$$

$$Y_i = a + bx_i$$

a) β es la relación de cambio de la propiedad medida dada con respecto al cambio de la cantidad de analito.

INTERVALO DE CONFIANZA:

$$b \pm t_{0.975, n-2} \cdot Sy/x \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$$H_0 : \beta = \beta_0$$

$$H_a : \beta \neq \beta_0 \quad \Rightarrow \quad \beta_0 = 0$$

en un sistema de medición adecuado, al variar la cantidad adicionada debe cambiar la propiedad medida.

DISTRIBUCION MUESTRAL: distribución t de student con n-2 grados de libertad.

$$t = \frac{b - \beta_0}{\frac{Sy/x}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$t_{cal} = \frac{b}{\frac{Sy/x}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

b) α es la propiedad medida del sistema a la cantidad de analito de cero.

INTERVALO DE CONFIANZA:

$$a \pm t_{0.975, n-2} \cdot Sy/x \sqrt{\frac{\bar{X}^2 + 1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$H_0: \alpha = \alpha_0$

$H_a: \alpha \neq \alpha_0 \Rightarrow \alpha_0 = 0$

ya que en teoría muchos sistemas dan propiedad medida cero a concentración cero del analito

DISTRIBUCION MUESTRAL: t de student con n-2 grados de libertad

$$t = \frac{\bar{y} - \alpha_0}{\frac{S_{y/x}}{\sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}}}} + 1$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$t_{calc} = \frac{\bar{y} - \alpha_0}{\frac{S_{y/x}}{\sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}}}} + 1$$

BASE DE INTERPRETACION: $t_{tab} = 0.975, n-2$

Si $|t_{calc}| < t_{tab}$ la ordenada pasa por el origen

Si $|t_{calc}| \geq t_{tab}$ la ordenada no pasa por el origen

c) **ASOCIACION** (asociación entre cantidad adicionada del analito y propiedad medida dado un modelo lineal)

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$H_0: \beta = \beta_0$

$H_a: \beta \neq \beta_0 \Rightarrow \beta_0 = 0$

ya que en teoría un sistema de medición es adecuado, si al variar la cantidad adicionada, varía la propiedad medida.

DISTRIBUCIÓN MUESTRAL: F con 1 grado de libertad en el numerador y n-2 grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\sigma^2 R}{\sigma^2 ER}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$F_{calc} = \frac{MC_R}{MC_{ER}}$$

d) **LINEALIDAD**

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$H_0: y = \alpha + \beta x$

$H_a: y \neq \alpha + \beta x$

determina si la asociación entre cantidad del analito y propiedad medida se describe satisfactoriamente mediante un modelo lineal.

DISTRIBUCION MUESTRAL: F con $(n-2) - \Sigma(r-1)$ grados de libertad en el numerador y $\Sigma(r-1)$ grados de libertad en el denominador

$$F = \frac{\sigma^2 FA}{\sigma^2 EP}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$F_{cal} = \frac{MCEA}{MCEP}$$

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
Regresión	1	$b^2 \Sigma xy + a^2 \Sigma y - (\Sigma y)^2 / n$	SCR/GLR	MCR/MCER
Error de regresión	n - 2	$\Sigma y^2 - b^2 \Sigma xy - a^2 \Sigma y$	BCER/GLER	MCER/MCEP
Falta de ajuste	$(n-2) - \Sigma(r-1)$	SCER - BCEP	BCFA/GLFA	MCFMCEP
Error puro	$\Sigma(r-1)$	$\Sigma y^2 - ((\Sigma y)^2 / r)$	SCER/GLEP	

e) **CORRELACION:** es el grado de asociación entre dos variables dado el modelo de regresión.

$$r^2 = \frac{[n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

3) ERROR SISTEMATICO CONSTANTE DEL METODO ANALITICO

EXACTITUD: concordancia absoluta entre un valor determinado y su valor real.
 μ : es la media poblacional de los recobros experimentales expresada en %.

a) ESTADISTICA DESCRIPTIVA

$$\bar{Y} = \Sigma y / n \quad s = \frac{n \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{n(n-1)} \quad C.V. = \frac{(s * 100)}{y}$$

INTERVALO DE CONFIANZA

$$Y \pm t_{0.975, n-1} * s / \sqrt{n}$$

4) ERROR SISTEMATICO PROPORCIONAL DEL METODO ANALITICO

La relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada del analito empleando el método analítico debe ser:

$$y_j = \alpha_0 + \beta_0 x_i + E_j(i)$$

y_j = cantidad recuperada

α_0 = ordenada al origen

β_0 = pendiente

x_i = cantidad adicionada del analito
 $E_j(i)$ = error del método ($\sigma_{y/x}$)

a) β es la relación de cambio de la cantidad recuperada de analito con respecto al cambio de la cantidad adicionada de analito.

INTERVALO DE CONFIANZA:

$$b \pm t_{0.975, n-2} \cdot Sy/x \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$$\begin{aligned} H_0: \beta &= \beta_0 \\ H_a: \beta &\neq \beta_0 & \Rightarrow & \beta_0 = 1 \end{aligned}$$

si el método carece de Error Sistemático Proporcional consistente la pendiente tiene asociado un valor igual a 1

DISTRIBUCION MUESTRAL: distribución t de student con n-2 grados de libertad.

$$t = \frac{b - \beta_0}{Sy/x \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$t_{cal} = \frac{b}{Sy/x \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

b) α es la respuesta del método al placebo o muestra no adicionada de analito

INTERVALO DE CONFIANZA:

$$a \pm t_{0.975, n-2} \cdot Sy/x \sqrt{\frac{\bar{x}^2 + 1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$$\begin{aligned} H_0: \alpha &= \alpha_0 \\ H_a: \alpha &\neq \alpha_0 & \Rightarrow & \alpha_0 = 0 \end{aligned}$$

ya que en teoría el método a cantidad adicionada de analito cero debe recuperar cero, es decir, el método carece de Error Sistemático Constante.

DISTRIBUCION MUESTRAL: t de student con n-2 grados de libertad

$$t = \frac{a - \alpha_0}{Sy/x \sqrt{\frac{\bar{x}^2 + 1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{S_{y/x}}{\sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}}}} \frac{+1}{n}$$

BASE DE INTERPRETACION: $t_{\text{tab}} = 0.975, n-2$

Error Sistemático Proporcional Constante:

Si $|t_{\text{calc}}| < t_{\text{tab}}$, el método carece de ESPC

Si $|t_{\text{calc}}| \geq t_{\text{tab}}$, el método presenta ESPC

Error Sistemático Proporcional Constante:

Si $|t_{\text{calc}}| < t_{\text{tab}}$, el método carece de ESPC

Si $|t_{\text{calc}}| \geq t_{\text{tab}}$, el método presenta ESPC

c) ASOCIACION (asociación entre cantidad adicionada del analito y la cantidad recuperada)

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$$H_0: \beta = \beta_0$$

$$H_a: \beta \neq \beta_0$$

$$\Rightarrow \beta_0 = 0$$

ya que en un método de medición adecuado, al variar la cantidad adicionada del analito debe cambiar la cantidad recuperada de éste.

DISTRIBUCION MUESTRAL: F con 1 grado de libertad en el numerador y n-2 grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\sigma^2_R}{\sigma^2_{ER}}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$F_{\text{calc}} = \frac{MCR}{MCER}$$

d) LINEALIDAD entre cantidad adicionada y recuperada del analito

PRUEBA DE HIPOTESIS:

$$H_0: y = \alpha + \beta x$$

$$H_a: y \neq \alpha + \beta x$$

determina si la asociación entre variables es descrita por un modelo lineal.

DISTRIBUCION MUESTRAL: F con (n-2) - $\sum(r_i - 1)$ grados de libertad en el numerador y $\sum(r_i - 1)$ grados de libertad en el denominador

$$F = \frac{\sigma^2_{FA}}{\sigma^2_{PE}}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$F_{cal} = \frac{MCFA}{MCEP}$$

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{cal}
Regresión	1	$b^2 \sum xy + a^2 \sum y - (\sum y)^2 / n$	BCR/GLR	MCr/MCEr
Error de regresión	n - 2	$\sum y^2 - b^2 \sum xy - a^2 \sum y$	BCER/GLER	MCER/MCEP
Falta de ajuste	(n-2) - Σ(r-1)	BCER - BCEP	BCFA/GLFA	MCFA/MCEP
Error puro	Σ(r-1)	$\sum y^2 - (\sum y)^2 / n$	BCEP/GLEP	

e) **CORRELACION:** es el grado de asociación entre dos variables dado el modelo de regresión.

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

6) ERROR SISTEMATICO CONSTANTE DEL METODO ANALITICO

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n} \quad s = \frac{n \sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)} \quad C.V. = \left(\frac{s}{\bar{y}} \cdot 100 \right)$$

INTERVALO DE CONFIANZA

$$\bar{y} \pm 10.975, n-1 \cdot s / n$$

6) PRECISION DEL METODO

Precisión es una medida de la concordancia relativa de un conjunto de mediciones analíticas. Se clasifica en reproducibilidad y repetibilidad.

El modelo hipotético que representa el estudio es:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + d_j(i) + s(i)k$$

y_{ijk} = valoración de la késima muestra por el iésimo analista en el jésimo día

μ = media poblacional

a_i = efecto del analista en la valoración

$d_j(i)$ = efecto del día anidado en el analista

$s(i)k$ = error del método analítico

a = número de analistas

d = número de días

r = número de replicaciones

a) PRUEBA DE HIPOTESIS PARA EL EFECTO DEL ANALISTA

$$H_0 : A = A_0$$

$$H_a : A \neq A_0 \quad \Rightarrow \quad A_0 = 0$$

ya que si un método es reproducible por los analistas, no debe existir efecto del analista.

DISTRIBUCION MUESTRAL: F con a-1 grados de libertad en el numerador y a(d-1) grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\sigma^2 s + r\sigma^2 d + d r \sigma^2}{\sigma^2 s + r\sigma^2 d}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$F_{cal} = \frac{MC_{\alpha}}{MC_d}$$

b) PRUEBA DE HIPOTESIS PARA EL EFECTO DEL DIA ANIDADO EN EL ANALISTA

$$H_0: d = d_0$$

$$H_a: d \neq d_0 \quad d_0 = 0$$

ya que si un método es reproducible en distintos días para un mismo analista, no debe existir efecto del día anidado en el analista.

DISTRIBUCION MUESTRAL: F con a(d-1) grados de libertad en el numerador y ad(r-1) grados de libertad en el denominador

$$F = \frac{\sigma^2 s + r\sigma^2 d}{\sigma^2 s}$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE:

$$F_{cal} = \frac{MC_d}{MC_s}$$

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
α	a-1	$\frac{\sum y_{i...}^2 - y_{...}^2}{dr}$	$\frac{SC_{\alpha}}{GL_{\alpha}}$	$\frac{MC_{\alpha}}{MC_d}$
$d(j)$	a(d-1)	$\frac{\sum \sum y_{ij}^2 - y_{i...}^2}{r}$	$\frac{SC_d}{GL_d}$	$\frac{MC_d}{MC_s}$
$sk(j)$	ad(r-1)	$\frac{\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \sum \sum y_{ij}^2}{r}$	$\frac{SC_s}{GL_s}$	

COEFICIENTE DE VARIACION

$$CV = \sqrt{\frac{\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - y_{...}^2 / adr}{adr - 1}} \cdot 100$$

$$\frac{y_{...}}{adr}$$

INTERPRETACION DE LA TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL METODO.

Si $F_{cal} < F_{tab}$ de la fuente de regresión, no existe relación entre la cantidad adicionada - propiedad medida o cantidad adicionada - cantidad recuperada del analito

Si $F_{cal} > F_{tab}$ de la fuente de regresión, existe una relación altamente significativa entre cantidad adicionada - propiedad medida o cantidad adicionada - cantidad recuperada del analito

Si $F_{cal} < F_{tab}$ de la fuente falta de ajuste, el modelo lineal representa de manera correcta la relación entre cantidad adicionada - propiedad medida o cantidad adicionada - cantidad recuperada del analito

Si $F_{cal} > F_{tab}$ de la fuente falta de ajuste, el modelo no representa de manera correcta la relación entre cantidad adicionada - propiedad medida o cantidad adicionada - cantidad recuperada del analito.

ANEXO IV

DIAGNOSTICO DE FORMULACIONES PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE EL SISTEMA DE MULTICOMPONENTES POR CUANTIFICACIÓN DEL ESPECTRO COMPLETO

Los medicamentos que aparecen en los cuadros siguientes fueron seleccionados como representativos del grupo de fármacos del cual forman parte, ya que existen otros nombres comerciales que presentan la misma formulación. La clasificación así como sus formulaciones, fueron tomadas del Diccionario de Especialidades Farmacéuticas en su 29a. edición.

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dic.	CONCLUSION
ANALGESICOS					
- BIFEBRAL - Ketoprofeno sódico Paracetamol	100 mg 300	HCl 0.1 N: 280 : 245	1 1	4	A
-BUSCAPINA COMPOSITUM - Hioscina butilbromuro Metamizol	20 mg 2.5 g	: 252,258,284 : 258	1 1	2	B
- BUSCAPINA COMPOSITUM N - Hioscina butilbromuro Paracetamol	10 mg 500	: 252,258,284 : 245	1 1	2	B
- FEBRAX - Naproxén sódico Paracetamol	275 mg 300 mg	: 282,272,315,328 : 245	1 1	4	A
- NORFLEX PLUS - Orfenadrina citrato Paracetamol	35 mg 450	Etolol : 284 HCl 0.1 N : 245	3 1	2	B
ANESTESICOS					
- ANESTH - CAINA E - Bupivacaína Epinefrina	5 mg 5 mcg	: 282 : 224,280,285	2 2	2	B

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
ANTIMICROBIANOS, ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES					
- ANITRIM - Trimetoprim Sulfametoxazol	80 mg 400	HCl 0.1 N: 271 : 285	1 1	4	A
-BACTRIM COMPOSITUM - Trimetoprim Sulfametoxazol Guayacol	800 mg 4000 1000	: 271 : 285 : 273	1 1 1	1	No se pueden cuantificar trimetoprim y guayacol
- PANTOBRON 500 Bromhexina clorh. Eritromicina	8 mg 500	: 245,310 pH 6.3 : 280	1 4	2	B
-PEDIAZOL GRANULADO- Eritromicina Sulfisoxazol	200 mg 600	: 280 HCl 0.1 N: 285	4 1	4	B
- MYAMBUTOL- Etambutol clorh. Isoniacida	300 mg 100	no absorbe HCl 0.1 N: 386	1 1	-	B
- RIFATER - Rifampicina Isoniacida Piracinamida	150 mg 75 400	: 231,283,338 : 286 : 286,312	1 1 1	1	B
-FURANTON- Metenamida Nitrofurantoína	250 mg 50	: 258,284 dimetilformamida: 280	1 1	3	B
-BENZANIL COMPUESTO- Penicilina G Penicilina G procainica Penicilina G benzatinica	300 000 U 300 000 600 000	no absorbe no absorbe no absorbe	1 1 1	-	B

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
ANTICONCEPTIVOS					
-ANAFERTIN- Dihidroprogesterona Estradiol enantato	75 mg 5	etanol : 240 : 231	1	2	B
-CILEST- Norgestimato Ethinilestradiol	250 mcg 35	no absorbe etanol : 231	1 1	-	B
-MARVELON- Desogestrel Ethinilestradiol	150 mcg 30	no absorbe etanol : 231	1 1	-	B
-NORINYL- Mestranol Noretisterona	50 mcg 1 mg	metanol : 276, 287 metanol : 240	4	2	B
ANTIFLATULENTOS					
-FARMEBAN- Diyodohidroquinoleina Dimeticona Homatoprina metilbromuro	500 mg 100 2.5	dioxano : 258 no absorbe HCl 0.1 N : 252, 258, 284	1 1 1	2,3	B
-HOMAFREN- Piperzolato bromuro Dimeticona	4 mg 20	: 252, 258, 282 no absorbe	1 1	-	B
ANTIMIGRAÑOSOS					
-ERGOCAF- Ergotamina tartrato Cafeina	1 mg 100	HCl 0.1 N : 318 : 273	1 1	2	B
-PARSEL- Dihidroergotamina tartrato Paracetamol Cafeina	1 mg 450 40	: 280 : 245 : 273	1 1	2	B

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-SYDOLIL- Ergotamina tartrato Ac. Acetilsalicílico Cafeína	1 mg	HCl 0.1 N : 316	1	2,4	No son cuantificables los 3 fármacos, pero efectuando las diluciones adecuadas se pueden cuantificar el ac. acetil salic. y la cafeína
	400	: 230, 278	1		
	50	: 273	1		
-TONOPAN- Dihidroergotamina mesilato Cafeína Propifenazona	0.5 mg	: 275, 281, 291	2	2,4	No son cuantificables los 3 fármacos, pero efectuando las diluciones adecuadas se pueden cuantificar la cafeína y propifenazona
	40	: 273	1		
	175	: 240	1		
AGENTES CARDIOVASCULARES					
-BLOKUM-DIU - Atenolol Clortalidona	100 mg	: 274	1	1,3	B
	25	etanol : 275			
-ASASANTIN- Dipiridamol Ac. Acetilsalicílico	75 mg	NaOH 0.1 N : 294	1	1	B
	50	: 297	1		
-SELOPRES- Metoprolol tartrato Hidroclorotiacida	100 mg	HCl 0.1 N : 221, 274, 281	1	1,2	B
	12.5	: 272, 318			
DERMATOLOGICOS					
-BAYCUTEN- Clotrimazol Dexametasona acetato	1.0 g	metanol : 254, 280	1	2	B
	0.040	: 240	1		
-DERMALOG C- Halcinonida Nistatina Neomicina	100 mg	: 238	4	2	B
	10 000 000 U	NaOH 0.1 N : 291, 305, 319	1		
	250 mg	no absorbe	1		

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-DIPROSONE G- Betametasona dipropionato Gentamicina sulfato	64 mg 100	etanol : 240 no absorbe	1 1	-	B
-DIPROSONE Y- Betametasona dipropionato Yodoclorohidroquinoleina	64 mg 3	etanol : 240 metanol : 255, 325	1	2	B
-KENACOB- Triamcinolona acetónico Neomicina sulfato Gramicidina Nistatina	1 mg 2.5 0.25 1 000 000 U	: 238 no absorbe no absorbe NaOH 0.1 N : 291, 305, 319	1 1 1 1	2.3	B
-LASALAR Y- Fluocinolona acetónico Yodoclorohidroquinoleina	0.025 g 3.0	etanol : 240 metanol : 255, 325	1 1	2	B
-QUADRIDERM- Gentamicina sulfato Yodoclorohidroquinoleina Betametasona 17-valerato	100 mg 1000 61	HCl 0.1 N : 247 metanol : 255, 325 etanol : 240	1 1 1	2	B
-VIOFORMO HIDROCORTISONA- Clloquinol Hidrocortisona	3 g 1	metanol : 255, 325 : 247	1 1	4	A
-LEDERFORM D- Clloquinol Triamcinolona	3 g 10 mg	: 255, 325 : 238	1 1	2	B
DESCONGESTIVOS EXPECTORANTES					
-ACTIFED- Pseudoefedrina clorh. Triplidina	60 mg 2.5	HCl 0.1 N : 251, 257, 263 : 290	1	4	A
-ACTIFED DM- Pseudoefedrina clorh. Triplidina clorh. Dextrometorfano bromhidrato	600 mg 25 200	: 251, 257, 263 : 290 : 278	1 1 1	4	A

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-AFRINEX CRONOSULES- D-bromfeniramina maleato D-isoefedrina sulfato	6 mg 120	HCl 0.1 N : 265 : 263	1 1	1,2	B
-AFRINEX INFANTIL- Ac. Acetilsalicílico Clorfeniramina maleato Fenilefrina clorh.	80 mg 0.5 2.5	: 230, 276 : 265 : 273	1 1 1	2	B
-ALFAN- Dextrometorfano bromhidrato Clorfeniramina maleato Efedrina clorh.	200 mg 40 150	: 278 : 295 : 251, 257, 263	1 1 1	1	B
-AMOXIBRON- Amoxicilina trihidratada Bromhexina clorh.	500 mg 8	: 230, 272 : 245, 310	1 1	2	B
-ANTIFLUS DES- Amanitidina clorh. Clorfeniramina maleato Fenilpropranolamina clorh. Paracetamol	50 mg 3 15 300	no absorbe HCl 0.1 N : 265 absorbancia no significativa HCl 0.1 N : 245	1 1 1 1	2	B
-ASAFEN- Fenilefrina clorh. Tenuidamina clorh. Paracetamol Cafeína	10 mg 15 300 50	: 273 no absorbe HCl 0.1 N : 245 : 273	1 1 1	1,2	B
-BENADREX- Difenhidramina clorh. Dextrometorfano bromhidrato	0.25 g 0.30	: 252, 257 : 276	1 1	4	A
-BISLVON AMPICILINA- Bromhexina clorh. Ampicilina Trihidrato	8 mg 250	: 245, 310 no absorbe	1 1	-	B

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-BREMAGAN EX- Guaifenesina Paracetamol Fenilefrina clorh. Clorfeniramina maleato	2 g 2.5 0.10 0.02	HCl 0.1 N : 273 : 245 : 273 : 285	1 1 1 1	1,2,4	No son cuantificables los 4 fármacos, pero si se efectua una dilución adecuada, se podrían cuantificar guaifenesina y paracetamol
-BREMAGAN INFANTIL- Acetaminofén Clorfeniramina maleato Fenilefrina clorh.	100 mg 1 2	: 245 : 285 : 273	1 1 1	2	B
-BRINCANYL EX- Terbutalina sulfato Guaifenesina	0.030 g 1.330	: 278 : 273	1 1	1,2	B
-CODERIT- Codeína clorh. Efedrina clorh.	10 mg 20	: 285 : 283	1 1	4	A
-CORIDICIN F- Clorfeniramina maleato Salicilamida Fenilefrina clorh.	4 mg 320 10	: 285 : 235, 298 : 273	1 1 1	2	B
-CORIDICIN EXPEC- Dextrometorfano bromhidrato Clorfeniramina maleato Salicilato de sodio Cafeína Guaifenesina	150 mg 20 2.250 g 300 mg 300	: 278 : 285 : 236, 303 : 273 : 273	1 1 1 1 1	1,2	B
-CORILIN F- Paracetamol Cafeína Fenilefrina clorh. Clorfeniramina maleato	300 mg 25 4 4	: 245 : 273 : 273 : 285	1 1 1 1	1,2	B

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	t_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-CHERACOL-					
Ac. acetilsalicílico	324 mg	HCl 0.1 N : 230, 278	1		
Cafeína	32.4	: 273	1	1,2	B
Clorfeniramina maleato	2	: 285	1		
Metoxifenaminio clorh.	25	: 274			
-FLUMIL-					
Bufenina clorh.	1.5 mg	: 273	1		
Difenpiralina clorh.	1.5	: 253, 258	1	1,2	B
Aminofenazona	40	: 257	1		
-GRANECOM-					
Dextrometorfano bromhidrato	200 mg	: 278	1		
Fenilefrina clorh.	100	: 273	1	2	B
Sodio citrato	2 g	: 243	1		
-ISOBUTIL-					
Isoprenalina clorh.	44 mg	: 279	1		
Ambroxilina	600	: 271	1	4	A
Bromhexina clorh.	80	: 245, 310	1		
-LMS-					
Paracetamol	200 mg	: 245	1		
Piritamina maleato	25	: 244	1	1,2	B
Fenilefrina clorh.	8	: 273	1		
Cafeína	50	: 273	1		
-POLARAMINE EXPEC-					
Declorfeniramina maleato	45 mg	: 286	1	1,2	B
Pseudoefedrina sulfato	400	: 251, 257, 283	1		
Guaifenesina	2	: 273	1		
-RINOFREN NF-					
Clorfeniramina maleato	12 mg	: 285	1		
Fenilpropranolamina	40	absorbancia no significativa	1	2	B
Paracetamol	300	HCl 0.1 N : 245	1		
Cafeína	30	: 273	1		

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-RINOFREN NF PEDIATRICO-					
Clorfeniramina maleato	2.0 mg	HCl 0.1 N : 285	1	4	A
Fenilpropranolamina	5.0	absorbancia no significativa	1		
Paracetamol	20.0	HCl 0.1 N : 245	1		
Cafeína	2.5	: 273	1		
-TUSICANOL-					
Dextrometorfano bromhidrato	300 mg	: 278	1	2	B
Clorfeniramina maleato	30	: 285	1		
Sulfoguaiacol	2 g	pH 7 : 279	3		
-VICK NYQUIL-					
Paracetamol	3.334 g	HCl 0.1 N : 245	1	2	B
Pseudoefedrina clorh.	0.200	: 251, 257, 283	1		
Dextrometorfano bromhidrato	0.100	: 278	1		
Doxilamina succinato	0.025	: 282	3		
-PRINDEX-					
Pseudoefedrina clorh.	30 mg	: 251, 257, 283	1	1,2	B
Carbinoxamina maleato	1	: 283	1		
DIURETICOS					
-CAPOZIDE-					
Captopril	50 mg	presenta inflexiones en la región de 220-230 sin presentar un máximo definido	2	-	B
Hidroclorotiazida	25	HCl 0.1 N : 272, 318	1		
-CO RENITEC-					
Enalapril maleato	20 mg	presenta inflexiones en la región de 251-230 sin presentar un máximo definido	2	-	B
Hidroclorotiazida	12.5	HCl 0.1 N : 272, 318	1		
-HIGROTON RESERPINA-					
Clortalidona	50 mg	etanol : 275, 284	1	2	B
Reserpina	0.25	: 287, 295	1		

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-BIODEXAN OFTENO- Dexametasona Neomicina Polimixina B Fenilefrina clorh.	0.10 g 0.35 1 625 000 U 0.15 g	metanol : 240 no absorbe no absorbe HCl 0.1 N : 273	1 1 1	4	A
-DECADRON CON NEOMICINA- Dexametasona Neomicina Fenilefrina clorh.	0.5 mg 3.5 5.0	metanol : 240 no absorbe HCl 0.1 N : 273	1 1 1	2	B
-FLUOROBIOPTAL- Dexametasona Cloramfenicol	0.1 g 0.5	metanol : 240 : 277	1 1	4	A
MEDICAMENTOS PARA OTORRINOLARINGOLOGIA					
-GRANEODIN A- Cetilpiridinio cloruro Benzocaína	2.5 mg 10.0	HCl 0.1 N : 280 : 272, 278	1 1	4	A
-OTALGAN- Cloramfenicol Prednisona acetato Lidocaína clorh.	1.0 g 0.30 1.0	etanol : 277 : 240 HCl 0.1 N : 283, 272	1 1 1	2,4	No son cuantificables los 3 fármacos, pero si se efectúa una dilución adecuada se podrían cuantificar cloramfenicol y lidocaína
-SOLDRIN OTICO- Hidrocortisona Cloramfenicol Benzocaína	1.0 g 2.5 2.0	Agua : 247 : 277 : 285	1 1 1	4	A
-SYNALAR NASAL- Fluocinolona acetónido Polimixina B Neomicina Lidocaína clorh.	0.010 g 1 000 000 U 0.350 g 0.250	etanol : 240 no absorbe no absorbe HCl 0.1 N : 273	1 1 1 1	2	B

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-SYNALAR OTICO- Fluocinolona acetónico Polimixina B Neomicina Lidocaína clorh.	0.025 g 1 000 000 U 0.350 g 2.0 g	etanol: 240 no absorbe no absorbe HCl 0.1 N : 263,272	1 1 1 1	2	B
PARASITOSIS					
-ENTERIDINA- Diyodohidroquinoleína Ftalilsulfacetamida Succinilsulfatiazol Tanato de caseína Pectina cítrica	0.15 g 0.20 0.20 0.05 0.05	dioxano : 258 HCl 0.1 N : 282 : 258 no absorbe no absorbe	1 1 1 1 1	3,4	No son cuantificables los 3 fármacos, pero con el disolvente adecuado se pueden cuantificar la ftalilsulfacetamida y el succinilsulfatiazol
-METODINE- Diyodohidroquinoleína Metronidazol	325 mg 250	dioxano : 258 HCl 0.1 N : 277	1 1	3	B
-TALIVIFORM- Sulfatidina Yodoclorohidroquinoleína Papaverina clorh.	300 mg 200 20	: 288 metanol : 255, 325 HCl 0.1 N : 250	1 1 1	4	A
PSICOTROPICOS					
-ADEPSIQUE- Amitriptilina clorh. Diacepam Perfenacian	10 mg 3 2	: 230 : 242, 285, 388 : 254	1 2 1	4	A
-HYDROMET- Metildopa Hidroclorotiazida	250 mg 25	: 279 : 272, 318	1 1	4	A
-LASILACTON- Espironolactona Furosemida	50 mg 20	etanol : 238 : 234, 273	1 1	4	A

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-MODRUCREN- Amilorida clorh. Hidroclorotiazida Timolol maleato	5 mg 50 20	HCl 0.1 N : 285, 381 : 272, 318 : 285	1 1 1	4	A
-RHEFLUIN- Amilorida clorh. Hidroclorotiazida	2.5 mg 2.5	: 285, 381 : 272, 318	1 1	4	A
-TRASINTESINA RETARD- Oxprenol clorh. Clortalidona	160 mg 20	: 273 : 275	1 1	1,3	B
HEMATINICOS					
-TRIALVIT- Hidroxocobalamina Tiamina clorh. Xilocaina clorh.	1000 mcg 100 mcg 2	: 284, 304, 482 : 246 : 283, 272	4 1 1	2	B
MEDICAMENTOS PARA OFTALMOLOGIA					
-ALIN OFTALMICO- Dexametasona Neomicina	0.90 mg 3.50	metanol : 240 no absorbe	1 1	-	B
-MUTABON A- Perfenacina Amitriptilina clorh.	4 mg 10	HCl 0.1 N : 254 : 239	1 1	4	A
-MOTIVAL- Flufenacina Nortriptilina	0.5 mg 10	metanol : 259 : 240	2 4	2	B
RELAJANTES MUSCULARES					
-BESEROL 500- Metamizol Clomezazona	500 mg 100	HCl 0.1 N : 259 : 280	1 1	4	A

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λmax (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-DOLAREN- Diclofenaco sódico Carisoprodol	50 mg 200	HCl 0.1 N : 273 no absorbe	1 1	-	B
-NAXODOL- Naproxén Carisoprodol	250 mg 200	HCl 0.1 N : 262, 272, 315, 328 no absorbe	1 1	-	B
-REUMOPHAN- Ketoprofeno Clorzoxazona	50 mg 250	HCl 0.1 N : 280 : 280	1 1	4	A
-ROBAXIFEN- Metocarbamol Paracetamol	400 mg 350	: 222, 273 : 245	1 1	4	A
-ROBAXISAL- Metocarbamol Ac. Acetilsalicílico	400 mg 325	: 222, 273 : 228, 278	1	1	B
-SOMALGESIC- Naproxén Carisoprodol	250 mg 200	: 262, 272, 315, 328 no absorbe	1 1	-	B
MEDICAMENTOS PARA PADECIMIENTOS URINARIOS					
- AZO-WINTOMYLON - Ac. Nefidibico Fenazopiridina clorh.	500 mg 50	HCl 0.1 N : 257, 315 etanol : 238, 277	1 1	2	B
-RIFAPRIM- Rifampicina Trimetoprim	300 mg 80	HCl 0.1 N : 231, 283 : 271	1	4	A
MEDICAMENTOS PARA PADECIMIENTOS VAGINALES					
-FLAGYSTAN V- Metronidazol Nistatina	500 mg 100 000 U	NaOH 0.1 N : 319 : 291, 305, 319	1 1	1	B

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-VAGITROL V- Fluocinolona acetónido Nistatina Metronidazol	0.50 mg 10 000 U 500 mg	etanol : 240 NaOH 0.1 N : 291, 305, 319 : 319	1 1 1	1, 2, 3	B
VITAMINAS					
-ADEKON- Retinol palmitato Ergocalciferol	12 000 UI 1 000	etanol : 325, 328 : 295	1 1	2	B
-ADEKON C- Retinol palmitato Ergocalciferol Ac. ascórbico	5 000 UI 400 60 mg	: 325, 328 : 295 HCl 0.1 N : 243	1 1 1	2, 3	B
-AUTRIN 600- Ac. fólico Fumarato ferroso Hidroxocobalamina Ac. ascórbico Tocoferol	1 mg 350 25 mcg 600 mg 24.7	pH 13 : 256, 283, 368 no absorbe HCl 0.1 N : 284, 304, 462 : 243 etanol : 294	4 4 4 1 4	2	B
-BEROCCA CALCIUM- Tiamina Riboflavina Nicotinamida Piridoxina Pantotenato de calcio Biotina Cianocobalamina Ac. ascórbico	15 mg 15 50 10 25 0.15 10 mcg 1 g	HCl 0.1 N : 246 : 223, 267, 376 : 291 : 291 no absorbe no absorbe HCl 0.1 N : 284, 304, 462 : 243	1 1 1 1 4 4 1	1, 2	No son cuantificables en medio ácido ya que la vit. C está en mayor proporción; en medio básico ésta no es soluble pero la tiamina se descompone con rapidez (Ref. 3)
-BENEXOL B12- Tiamina Piridoxina Cianocobalamina	50 mg 250 1	: 246 : 291 : 284, 304, 462	1 1 4	4	No son cuantificables las 3 vitaminas, pero si se efectúa una dilución adecuada se podrían cuantificar tiamina y piridoxina

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-BEPLENOVAX-					
Dextrosa	5 g	no absorbe	1		
Tiamina	10 mg	HCl 0.1 N : 246	1		
Riboflavina	4	: 223, 267, 376	1	4	A
Nicotinamida	50	: 261	1		
Piridoxina	5	: 291	1		
-DEXTREVIT-					
Dextrosa	5 mg	no absorbe	1		
D-pantenol	10	no absorbe	1		
Niacinamida	100	HCl 0.1 N : 261	1		
Tiamina	100	: 246	1	1,2	B
Riboflavina	4	: 223, 267, 376	1		
Piridoxina	5	: 290	1		
Ac. ascórbico	500	: 243	1		
-DECA-VI-SOL -					
Retinol palmitato	5 000 UI	etanol : 325, 326	1		
Tocoferol	1 000	: 265	1		
Ac. ascórbico	50 mg	HCl 0.1 N : 243	1		
Tiamina	1	: 246	1		
Riboflavina	1.5	: 223, 267, 376	1	1,2	B
Piridoxina	1	: 290	1		
Cianocobalamina	1 mcg	: 264, 304, 462	4		
Niacinamida	10 mg	: 261	1		
Pantenol	3	no absorbe	1		
Biotina	30 mcg	no absorbe	1		
-DOLO NEUROBION-					
Tiamina	50 mg	HCl 0.1 N : 246	1		
Piridoxina	100	: 290	1	4	A
Cianocobalamina	100 mcg	: 264, 304, 462	4		
Metamizol	250 mg	: 256	1		
-MANIBEE COMPLEJO-					
Tiamina	3 mg	: 246	1		
Riboflavina	3	: 223, 267, 376	1		
Nicotinamida	20	: 261	1	4	A
Piridoxina	4	: 290	1		
Pantenol	10	no absorbe	1		

FARMACO	CONCENTRACION EN FORMULACION	λ_{max} (nm)	Ref.	Dx	CONCLUSION
-DOLO NEUROBION INYECTABLE-					
Tiamina	100 mg	HCl 0.1 N : 246	1	4	A
Piridoxina	100	: 261	1		
Cianocobalamina	1	: 284, 304, 462	4		
Lidocaina	30	: 258	1		
-PALADAC-					
Palmitato de retinol	40 000 UI	etanol : 325, 328	1	1, 2, 3	B
Ergocalciferol	4 000	: 285	1		
Tiamina	60 mg	HCl 0.1 N : 246	1		
Riboflavina	50	: 223, 267, 376	1		
Piridoxina	20	: 260	1		
Cianocobalamina	100 mcg	: 284, 304, 462	4		
Nicotinamida	400 mg	: 261	1		
Ac. ascórbico	1 g	: 243	1		
-POLY VI SOL-					
Retinol palmitato	5 000 UI	etanol : 325, 328	1	1, 2, 3	B
Ergocalciferol	1 000	: 285	1		
Ac. ascórbico	50 mg	HCl 0.1 N : 243	1		
Tiamina	1	: 246	1		
Riboflavina	0.8	: 223, 267, 376	1		
Niacinamida	8	: 261	1		

SIMBOLOGIA

Ref. Referencia	donde	1) Clerk's, <i>Isolation and Identification of Drug Substances</i> 2) Florey, K.; <i>Analytical Profile of Drug Substances</i> , Vol. 1,2,7,9,11,16 3) U.S.P. XXI 4) The Merck Index, 11th ed.
Dx. Diagnóstico	donde	1) Se presenta gran superposición de espectros entre fármacos 2) Existe gran diferencia entre concentraciones 3) Hay incompatibilidad de solubilidades 4) La diferencia entre concentraciones no es muy grande y sus λ_{max} no son muy cercanas
Conclusión	donde	A) Los fármacos se pueden cuantificar por el sistema de multicomponentes por CEC B) Los fármacos no son cuantificables por el sistema de multicomponentes por CEC

9.0. BIBLIOGRAFIA.

1. Willard H. H., Meritt L. L. *Instrumental methods of analysis*, 7a. ed. Ed. Wadsworth. E.U.: (1988) p 95-153
2. Strobel H.A. *Chemical instrumentation*. 3a. ed. Ed. Addison-Wesley. New York:(1980) p 103-145.
3. Schimer R.E. *Modern methods of pharmaceutical analysis* Vol 1, Ed. RC Press Inc., E.U. (1982) p 31-60
4. López A.P., López M.L. *Una introducción a la espectrometría de derivadas*. Ed. Química.(1986) 4(3): 160-170
5. Sánchez R.F., Bosch C.J. *Derivate ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications*. *Talanta* (1988) 35(10): 753-761
6. Brown W.C., Obremaki J.R. *Matrix representations and criteria for selecting analytical wavelengths for multicomponent spectroscopic analysis*. *Anal. Chem.*(1982) 54: 1472-1479
7. Otto M, Weescheider W. *Spectrophotometric multicomponent analysis applied to trace metal determinations*. *Anal. Chem.* (1985) 57: 63-69
8. Frans S.D., Harris J.M. *Selection of analytical wavelengths for multicomponent spectrophotometric determinations*. *Anal. Chem.* (1985) 57: 2680-2684
9. Weismüller A.J., Chanedy A. *Quantitative multicomponent analysis of complex mixture by means of full spectrum quantitation and principal component analysis*. *Trends Anal. Chem.*(1992) 11(3): 86-90
10. Fuller M.P., Ritter G.L. and Draper C.S. *Partial least squares quantitative analysis of infrared spectroscopic data. Part 1: Algorithm implementation*. *Appl. Spectrosc.*(1988) 42(2): 217-227
11. Sternberg J.C., Sillio S.H. and Schwendeman Y. *Spectrophotometric analysis of multicomponent systems using the least squares methods in matrix form*. *Anal. Chem.*(1980) 32(1): 84-90
12. Geleadi P., Kowaleki B. *Partial least squares regression: a tutorial*. *Anal. Chem. Acta.* (1986) 185:1-17

13. Hwang J.D., Wirefordner J.D. *Regression methods in analytical chemistry. Prog. Analyt. Spectrosc. (1988) 11: 209-249*
14. Donahue M.S., Brown W.C. *Analysis of deoxyribonucleotides with principal component and partial least squares regression of UV after fourier preprocessing. Appl. Spectr. (1990) 44(3): 407-413*
15. Perkin Elmer Co. *PMULT software package for multicomponent analysis in UV/VIS spectroscopy. Reference Manual, Fed. Rep. of Germany (1990)*
16. Huber L. *Good laboratory practice. Hewlett Packard Co., Germany (1993) p 31-44*
17. Weller D.L.M. *GLP and quality assurance. Anal. Proc. (1988) 25:199-200*
18. Paul W.L. *USP Perspectives on analytical methods validation. Pharm. Technol. (1991) 15(3):130-141*
19. Taylor J.M., Peterson W.A. in *Good laboratory practice regulation A.F. Hirsch de. Marcel Dekker, N.Y. 1989*
20. Comité de Validación de Guías Oficiales de Validación. *Validación de métodos analíticos. Secretaria de Salud-Colegio de QFB's, México (1991) p 1-10 y 54*
21. Maldoner G. *Requirements and tests for HPLC apparatus and methods in pharmaceutical quality control. Chromatog. (1989) 28: 85-88*
22. Alcantara P.A. y Santana C.L. *Sistema de análisis estadístico de validación de métodos analíticos. Manual del Usuario. Noviembre 1992*
23. Wernimont G.T. *Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. Editado por William Spendley de Association of Official Analytical Chemists. E. U.: (1993) p. 9 y 78 - 80.*
24. Moffat A.C. *Clarke's. Isolation and identification of drugs. 2nd ed. Ed. The Pharmaceutical Press, London. (1986)*
25. Budavary S. *The merck index. 11th de. Merck & Co. Inc. USA. (1989)*
26. Doyle T.D. *Analysis for acetaminophen and phenylephrine in a capsule preparation. J. Pharm. Sci. (1974) 63(1):91-93*

27. Kirchoefer R.D. *Determination of antihistamines by UV.* J. Pharm. Belg. (1973) 28(4): 410-416
28. McDowell A.E. *Simultaneous multicomponent drug determinations with a vidicon spectrometer.* J. Pharm. Sci. (1978) 67(6): 822-826
29. Warner I.M. *Spectrophotometric determination of chlorpheniramine maleate and caffeine.* Drug. Dev. Ind. Pharm. (1991) 17(3):457-461
30. Tobias D.Y. *First-derivate spectroscopic determination of acetaminophen and sodium salicylate in tablets.* J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1983) 66(6):1450-1454
31. Schwendeman R.H. *Simultaneous multi-wavelength spectrophotometric quantitation of active components in analgesic formulation. Comparative study of three calculation methods.* J. Pharm. Biomed. Anal. (1988) 8(6):775-772
32. Lenden W.O. *Third derivate spectrophotometric simultaneous determination of vit. A and E.* Anal. Chem. Acta (1991) 248:583-587
33. Davidson A.G. *Assay of ephedrine or pseudoephedrine in pharmaceutical preparations by second and fourth derivate ultraviolet spectrophotometry.* Analyst (1982) 107: 879-884
34. Sukomal D. *Simultaneous spectrophotometric determination of mefenamic acid and paracetamol in pharmaceutical preparations.* Analyst (1989) 114: 101-103
35. Blanco M. *Application of a photodiode array detector to multicomponent determination by flow injection analysis.* Analyst (1987) 112:819-822
36. Othman S. *Multicomponent derivate spectroscopic analysis of sulfamethaxazole and trimethoprim.* Int. J. of Pharm. (1990) 63:173-176
37. Eboka C.J. *Spectrophotometric assay of drugs in the presence of spectral interforants in suspensions and syrups.* Int. J. of Pharm. (1989) 51:263-267
38. Leung C.P. and Keung L.C. *Determination of chlorpheniramine maleate in tablets by second derivate absorption spectrophotometry.* Analyst (1989) 114:341-343
39. Basu D. and Mahalanabis K. *Simultaneous spectrophotometric determination of metronidazole and funazolidone with multistandard addition and a least squares method.* Anal. Chem. Acta (1991) 249:349-352

40. Salem H. *UV and UV derivative spectrophotometric determination of two component mixtures.* *Spect. Lett.* (1991) 24(3): 451-470
41. Rosenstein S.E. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas.* 39a. ed., Ed. PLM SA de CV, México (1993)