

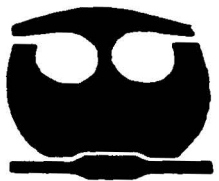


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR ACETAMINOFEN Y CAFEINA EN UNAS TABLETAS QUE ADEMAS CONTIENEN CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
CAROLINA FLORES AVILA



MEXICO, D.F.



AÑO 2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central




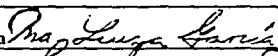
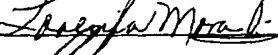

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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:	Prof. María Luisa García Padilla	
Vocal:	Prof. Inés Fuentes Noriega	
Secretario:	Prof. Rosa Lorenia Mora Tovar	
1er. Suplente	Prof. Consuelo Avala Mondragon	
2o. Suplente	Prof. Norma Trinidad Gonzalez Monzon	
Sitio donde se desarrolló el tema:	Departamento de desarrollo analítico de la Facultad de Química	
Asesor del tema:	Q.F.B. María Luisa García Padilla	
Supervisor técnico:	Q.F.B. Rosa Lorenia Mora Tovar	
Sustentante:	Carolina Flores Avila	

Agradecimientos:

A Dios

**A mis padres Rodolfo y Luz que me dieron
libertad para elegir mi camino apoyándose
en todo momento**

**A Javier que incondicionalmente esta conmigo y
cuyo amor agradeceré eternamente**

**A Dulce Karina, mi chiquita adorada, que
vino a darle un nuevo sentido a mi vida**

**A mis hermanos Gabriel y Edgar por toda su
ayuda y porque sé que cuento con ellos**

Quiero agradecer de manera muy especial a la Q.F.B. Maria Luisa García Padilla, Jefe del departamento de Desarrollo Analítico de la Facultad de Química y a la Q.F.B. Lorenia Mora Tovar todo el apoyo y asesoría brindada para la realización de este trabajo.

Maestras Maria Luisa y Lorenia me siento muy afortunada de haber contado con parte de su valioso tiempo

A todo el departamento de Desarrollo Analítico. Maestras Tere, Gina, Chelo, Isaura y Sra. Amparito muchas gracias

A la Facultad de Química

A todos mis Maestros

A todos mis compañeros y amigos que hicieron de mi estancia en la Facultad una etapa muy especial y nostálgica en mi vida.

INDICE

	PAGINA
I.- INTRODUCCION.....	2
II.- GENERALIDADES.....	4
II.1.0- ACETAMINOFEN.....	4
II.2.0- CAFEINA.....	5
II.3.0- MONOGRAFIA DE ACETAMINOFEN.....	7
II.4.0- MONOGRAFIA DE CAFEINA.....	12
II.5.0- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	15
III.- PARTE EXPERIMENTAL.....	34
III.1.0 METODO ANALITICO PARA LA VALORACION DE ACETAMINOFEN.....	36
III.2.0 METODO ANALITICO PARA LA VALORACION DE CAFEINA.....	39
IV.- VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS.....	42
IV.1.0- ESPECIFICIDAD.....	42
IV.2.0- LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	43
IV.3.0- REPETIBILIDAD DEL SISTEMA.....	43
IV.4.0- LINEALIDAD DEL METODO.....	43
IV.5.0- EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100% DEL METODO.....	44
IV.6.0- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.....	44
IV.7.0- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.....	44
V.- RESULTADOS.....	46
V.1.0- ESPECIFICIDAD.....	46
V.2.0- LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	51
V.3.0- REPETIBILIDAD DEL SISTEMA.....	58
V.4.0- LINEALIDAD DEL METODO.....	59
V.5.0- EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100% DEL METODO.....	67
V.6.0- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.....	69
V.7.0- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.....	72
VI.- CONCLUSIONES.....	76
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	80

I. - INTRODUCCION

La industria farmacéutica en su afán por brindar mayor variedad de productos, ha recurrido al desarrollo de polifármacos. El gran número de combinaciones de principios activos, dosis, así como el tipo de excipientes necesarios para cada forma farmacéutica, hace necesario el desarrollo y validación de métodos para analizar dichos productos.

El acetaminofén es un analgésico que ofrece una buena alternativa al consumo de salicilatos, por tanto, existen en el mercado muchas presentaciones, formas farmacéuticas y polifármacos basados en este principio activo.

La cafeína, por su parte, produce estado de alerta, disminución del sueño y sensación de bienestar. Estas características han hecho que existan múltiples productos para el dolor y resfriado que contienen en su formulación algún analgésico en combinación con cafeína.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar métodos espectrofotométricos para cuantificar acetaminofén y cafeína en unas tabletas que además contienen clorhidrato de fenilpropanolamina. Partiendo de diferencias de coeficiente de distribución, propiedades ácido base y concentraciones, se planteó la separación y cuantificación de los principios activos, para posteriormente, validar los métodos propuestos.

La validación de los métodos se efectuó mediante estudio estadístico de la evaluación de los siguientes parámetros:

Para el sistema

- Linealidad
- Precisión, evaluada como Repetibilidad

Para el método

- Especificidad
- Linealidad
- Exactitud
- Precisión, evaluada como Repetibilidad y Reproducibilidad
- Estabilidad de la muestra analítica

Estos parámetros se eligieron tomando en cuenta que se trata de métodos analíticos aplicados en el control de calidad del producto farmacéutico.

II.- GENERALIDADES

II.1.0- ACETAMINOFEN ^{1,2,6}:

Desde hace aproximadamente 50 años se ha venido utilizando el acetaminofén y la fenacetina como alternativas eficaces a los salicilatos, puesto que su actividad analgésico-antipirética es equivalente, aunque no poseen actividad antiinflamatoria. El acetaminofén tiene toxicidad menor a la de la fenacetina y se tolera mejor que la aspirina, por lo que se ha difundido su uso, además de ser una alternativa para la gente alérgica a la aspirina. Es común encontrar en el mercado, productos con este principio activo, solos o combinados con otros analgésicos, antihistamínicos y agentes antiseoretos.

La acción antipirética del acetaminofén es explicada por su acción en el centro hipotalámico regulador del calor. La regulación de la temperatura corporal requiere de un delicado equilibrio entre la producción y la pérdida del calor. El hipotálamo regula el punto exacto en el cual se mantiene la temperatura corporal. En el caso de la fiebre, este punto, obviamente, está elevado.

La fiebre puede ser el resultado de una infección o una de las secuelas de daños tisulares, inflamación, rechazo de injertos, procesos malignos u otros estados patológicos. Muchos

microorganismos pueden causar fiebre. Existen pruebas de que las endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos de la pared celular) actúan estimulando la biosíntesis y liberación por los neutrófilos y otras células de un pirógeno endógeno.

Hay evidencias de que la elevación resultante de la temperatura corporal está mediada por la liberación de prostaglandinas. El acetaminofén es un inhibidor débil de la biosíntesis de prostaglandinas, pero algunas pruebas sugieren que es más efectivo contra las enzimas del sistema nervioso central que con las de la periferia, lo que puede explicar su acción antipirética y analgésica.

El dolor inflamatorio se debe a las sustancias liberadas, principalmente a la histamina, serotonina y prostaglandinas, así como por la acidez local. Puede presentarse fiebre debida a sustancias pirogénicas bacterianas o formadas por leucocitos que actúan sobre el centro termorregulador.

Las prostaglandinas son asociadas al desarrollo del dolor, se cree que tienen la capacidad de sensibilizar los receptores del dolor a la estimulación mecánica o química.¹

II.2.0-CAFEINA^{1,2,6} :

Es común encontrar productos farmacéuticos de venta libre para el dolor, el resfrío, el asma y síntomas menstruales, en donde la cafeína está en combinación con otros fármacos.

La cafeína, que pertenece al grupo de las xantinas, existe en estado natural en una serie de plantas originarias de diversas partes del mundo (café, té, cacao, mate, kola y guaraná). Las xantinas de importancia farmacológica resultan de la metilación de los átomos de nitrógeno heterocíclico. La cafeína es una trimetilxantina.

La cafeína está clasificada como estimulante del sistema nervioso central y sus principales acciones farmacológicas se le atribuyen a su poder inhibitorio de la fosfodiesterasa y antagonismo de receptores de adenosina.

II.3.0-MONOGRAFIA DE ACETAMINOFEN ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,12}

II.3.1. - Origen:

El acetaminofén es un compuesto de origen sintético que deriva del p-aminofenol, a su vez derivado de la anilina.

La anilina posee propiedades analgésicas y antipiréticas, pero resulta demasiado tóxica para uso clínico. Por ello, se buscaron derivados que fueran menos tóxicos, llegando al paracetamol o acetaminofén.¹

II.3.2. - Sinónimos:

Paracetamol, p-hidroxiacetanilina.⁷

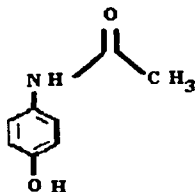
II.3.3 - Nombres comerciales:

Calpol, cetal, eneril, febrilix, pamol, panadol, panasorb, panets, tetmal, tabalgin, tilenol.⁷

II.3.4- Fórmula condensada:



II.3.5. - Fórmula desarrollada:



II.3.6. -Masa molecular:

151.2

II.3.7. -Descripción:

Polvo blanco cristalino.

II.3.8. -Solubilidad:

Fácilmente soluble en etanol y metanol, soluble en acetona, agua caliente y solución 1N de hidróxido de sodio; poco soluble en cloroformo.

II.3.9. - Punto de fusión:

Entre 168°C - 172°C

II.3.10. - Métodos oficiales de valoración

a) Método titulométrico.

Disolver 300 mg de la muestra en una mezcla de 10 mL de agua y 30 mL de una solución 1N de ácido sulfúrico, calentar a reflujo durante 1 hora. Enfriar y transferir la muestra a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir con agua a su volumen. A 20 mL de esta solución, agregar: 40 mL de agua, 40 g de hielo, 15 mL de solución 2N de ácido clorhídrico y 0.1 mL de solución indicadora de sulfato de ferroína. Titular con solución valorada 0.1M de sulfato cérico amónico, hasta la aparición de una coloración amarilla. Realizar un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de la solución 0.1 M de sulfato cérico amónico equivale a 7.56 mg de $C_8H_9NO_2$.

b) Método espectrofotométrico.

En un matraz volumétrico de 500 mL, transferir 120 mg de la muestra, pesados con exactitud. Disolver en 10 mL de metanol y

llevar al aforo con agua. Transferir 5 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al aforo con agua. Determinar la absorbancia de esta solución y la de una solución de referencia que contenga 12 µg/mL de la sustancia de referencia de acetaminofén, preparada de forma similar, a 244 nm, utilizando celdas de 1 cm y agua como blanco de ajuste. Calcular la cantidad en mg de acetaminofén por medio de la siguiente fórmula:

$$10C (Am/Asref)$$

En donde C es la concentración de acetaminofén, en microgramos por mililitro, de la solución de referencia. Am y Asref son las absorbancias obtenidas con la solución de la muestra y la solución de referencia, respectivamente.

II.3.11. - Acción farmacológica:

El acetaminofén posee propiedades antipiréticas y analgésicas que no difieren mucho de las de la aspirina, al provocar un descenso de la temperatura en animales y humanos febriles. Alivia dolores somáticos y difiere de la aspirina al tener bajo poder antiinflamatorio.

No se conoce con precisión la forma en que actúa el acetaminofén. Es inhibidor débil de ciclooxigenasa en los tejidos periféricos, lo que explica que tenga bajo poder antiinflamatorio. Es probable que sea un inhibidor más eficaz de

la síntesis de prostaglandinas en sistema nervioso central y de ahí se explica su acción analgésica y antipirética.

A dosis terapéuticas únicas o repetidas no tiene efecto sobre los sistemas cardiovascular y respiratorio. No produce irritación gástrica, erosión o hemorragia, lo cual puede ocurrir después de la administración de salicilatos. No tiene efecto sobre las plaquetas, el tiempo de sangrado ni la excreción de ácido úrico.

II.3.12. -Farmacocinética:

Absorción: Es absorbido completamente a través de vías digestivas. La concentración máxima plasmática ocurre en 0.5 a 2 horas. La vida media plasmática es de 2 horas aproximadamente a dosis terapéutica.

Distribución: Es uniforme en casi todos los líquidos corporales, a dosis terapéuticas puede recuperarse del 90 al 100% del fármaco, en la orina el primer día.

Metabolismo: Cerca del 90 a 95% se metaboliza en el hígado.

Excreción: Se excreta en la orina. La vida media de eliminación varía de 1 a 4 horas. En sobredosis aguda, la vida media de eliminación está correlacionada con los efectos tóxicos.

II.3.13. - Usos terapéuticos:

Es efectivo para el alivio de cefaleas, dismenorrea, mialgias, neuralgias y fiebre y como sustituto de la aspirina, en

especial en niños con infecciones virales y en individuos con cualquier tipo de intolerancia a la aspirina.

II.3.14. -Toxicidad:

El acetaminofén a dosis terapéutica recomendada es en general bien tolerado. En ocasiones se produce erupción cutánea y otras reacciones alérgicas.

A sobredosis aguda provoca necrosis hepática dosisdependiente, potencialmente fatal. Puede esperarse un daño hepático mínimo con niveles plasmáticos de acetaminofén de alrededor de los 120 µg/mL, 4 horas después de la ingesta y un daño severo con niveles plasmáticos de más de 200 µg/mL, 4 horas después de la ingesta.

II.4.0. -MONOGRAFIA DE CAFEINA^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,12}

II.4.1- Origen:

La cafeina es un alcaloide que proviene de plantas de amplia distribución geográfica.

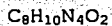
II.4.2 -Sinónimos:

Guaranina, metilteobromina

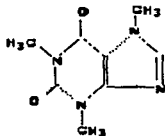
II.4.3. - Nombre químico:

3,7 Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purin-2,6-diona.

II.4.4. -Fórmula condensada:



II.4.5-Fórmula desarrollada:



II.4.6. -Masa molecular:

194

II.4.7. -Descripción:

Polvo blanco, cristalino o agujas brillantes, generalmente aglomeradas. La forma hidratada es eflorescente al aire.

II.4.8. -Solubilidad:

Fácilmente soluble en cloroformo; poco soluble en agua y en etanol; ligeramente soluble en éter.

II.4.9. - Punto de fusión:

Entre 235°C - 237.5°C. Determinar empleando la muestra seca a 80°C durante 4 horas.

II.4.10. - Método oficial de valoración:

Disolver 400 mg de la muestra en 40 mL de anhídrido acético, calentar suavemente, enfriar, agregar 80 mL de benceno y titular con solución 0.1N de ácido perclórico; determinar el punto final potenciométricamente. Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 19.42 mg de cafeína.

II.4.11. - Acción farmacológica y usos terapéuticos:

La cafeína pertenece a un grupo de fármacos llamados xantínicos, considerados como estimulantes del sistema nervioso central. Estimula las funciones psíquicas dando una sensación de bienestar cuando se usa a dosis terapéuticas (150 a 300 mg), lo que aparentemente no es seguido de depresión; el esfuerzo intelectual se hace más fácil, lo mismo que la asociación de ideas, la atención y la capacidad de concentrarse.

La cafeína se ha incorporado a numerosas preparaciones de venta libre muy usadas en la analgesia y en el tratamiento de apnea prolongada.

Relaja el músculo liso, en forma más notable el bronquial, estimula el sistema nervioso central y el músculo cardíaco, actúa sobre el riñón produciendo diuresis. Por lo general las personas que ingieren cafeína o bebidas que la contienen suelen

experimentar, menos somnolencia, menos fatiga y un flujo más claro de pensamiento. Sin embargo, a dosis más altas produce irritabilidad, nerviosismo, ansiedad, insomnio y temblores. Grandes cantidades de cafeína pueden reactivar las úlceras al estimular la secreción gástrica de ácido.

En dosis mayores puede usarse para tratar el asma.

II.4.12. -Farmacocinética:

Se absorbe con rapidez después de la administración oral, rectal o parenteral. Se distribuye en todos los compartimentos corporales, atraviesa la barrera hematoencefálica y la placenta. Se metaboliza en el hígado y se excreta en orina.

II.4.13. -Toxicidad:

La intoxicación fatal es rara; aunque la dosis letal a corto plazo parece ser de 5 a 10 g, pueden observarse reacciones indeseables después de la ingestión de 1g. Estas son principalmente referibles al sistema nervioso central y sistema circulatorio. Los síntomas son: insomnio, intranquilidad y excitación, pudiendo progresar al delirio.

II.5.0. -VALIDACION DE METODOS ANALITICOS ^{4.10.11}

Validación de métodos analíticos es el proceso para determinar la conveniencia de un determinado método para proveer resultados analíticos útiles y confiables. Hay que demostrar estadísticamente que el método es preciso, exacto y específico mediante estudios de laboratorio, estableciéndose que las características de capacidad cumplen los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Al desarrollar un método es indispensable definir las condiciones en las que habrá de llevarse a cabo. Se decide si un método es útil y confiable, después de que han sido evaluadas sus características, con respecto a los resultados requeridos en un conjunto específico de condiciones, a través de la validación.

Los criterios que deben cumplir los parámetros analíticos son establecidos por organismos que han publicado una serie de normas y especificaciones que deben respaldar al método analítico. Tomando esta referencia, cada laboratorio realiza la validación de sus métodos analíticos de acuerdo con sus requerimientos y criterios.

A continuación se describen los parámetros que se consideraron para la validación de los métodos analíticos, para cuantificar

acetaminofén y cafeína, en unas tabletas que además contienen clorhidrato de fenilpropanolamina.

II.5.1. -Linealidad del sistema

Debe demostrarse que la relación entre la concentración del analito y la respuesta del detector, sigue una relación matemática definida y constante; se pretende comprobar que la función sea lineal, o dicho de otra forma, que la respuesta obtenida sea proporcional a la concentración.

Se le llama linealidad, al grado en que la curva de calibración analítica se aproxima a la función matemática.

La linealidad del sistema se determina al realizar el análisis del analito, utilizando un mínimo de cinco soluciones con concentraciones diferentes, incluyendo el 100%, preparadas a partir de una solución. Los valores que representan la concentración del analito y los resultados de las respuestas obtenidas, se tratan por el método de mínimos cuadrados para evaluar la correlación lineal entre los datos.

Como criterios de aceptación se debe cumplir lo siguiente:

- a) $r \geq 0.99$
- b) $r^2 \geq 0.98$
- c) C.V. $\leq 1.5\%$

II.5.2. -Repetibilidad del sistema.

Es la precisión del sistema, expresada como la concordancia entre los valores de los resultados que se obtienen de determinaciones independientes, realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas. Se analizan un mínimo de 6 soluciones del analito de interés, con una concentración al 100%, establecida en la linealidad del sistema. Se evalúa con el coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{S_x}{\bar{x}} \times 100$$

Donde: C.V. = Coeficiente de variación

S_x = Desviación estándar

\bar{x} = Media de la serie de datos

Teniendo como criterio de aceptación el siguiente:

$$C.V. \leq 1.5\%$$

II.5.3. -Especificidad.

Es la capacidad de un método analítico para que la respuesta obtenida proceda del analito de interés y no de otros componentes que estén presentes en la formulación, como principios activos adicionales, excipientes o productos de degradación.

La prueba de especificidad se realiza de acuerdo con su aplicación. En el caso de métodos indicadores de control de calidad en formas farmacéuticas, se efectúa para conocer las posibles interferencias debidas a los demás componentes de la formulación. Así, la especificidad del método analítico se determina analizando muestras que correspondan al placebo cargado con todos los componentes de la formulación, sin incluir el analito de interés, al placebo con todos los componentes de la formulación, incluyendo el analito de interés y a la solución del analito al 100%.

Se comparan los resultados y se concluye que el método es específico si el espectrograma de la muestra del placebo cargado con todos los componentes de la formulación sin incluir el analito de interés, no muestra señal de absorbancia en la longitud de onda en que se realiza la determinación y los espectrogramas de las muestras del placebo con todos los componentes de la formulación incluyendo el analito de interés y a la solución del analito al 100% muestran espectrogramas similares. De esta forma se demuestra que el método desarrollado es capaz de cuantificar el analito de interés sin que exista interferencia de los otros componentes de la formulación.

Criterio de aceptación: confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

II.5.4. -Linealidad del método.

Se determina con placebos adicionados del analito, preparados de manera independiente, cuando menos a 3 diferentes concentraciones, incluyendo el 100%. Los análisis de cada concentración se realizan por triplicado. Se grafica la relación entre la cantidad adicionada del analito y la cantidad recuperada.

La línea recta que se obtiene a través de este tratamiento estadístico está definida por la ecuación siguiente:

$$y = mx + b$$

Donde : y = cantidad recuperada

x = cantidad adicionada

b = ordenada al origen

m = pendiente

Las transformaciones matemáticas utilizadas en el análisis de regresión son:

$$\text{Pendiente (m)} = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$\text{Ordenada al origen (b)} = \frac{\sum y - m(\sum x)}{n}$$

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

Coeficiente de regresión = $[r^2]^{1/2}$

Donde:

n = número de datos

x = Cantidad adicionada de fármaco

y = Cantidad recuperada de fármaco

En ausencia de errores, la línea recta de regresión tiene una pendiente de 1, un intercepto de 0 y un coeficiente de correlación de 1. Sin embargo, en la práctica esto no ocurre, ya que, aún cuando los errores sistemáticos se eliminan, los errores aleatorios provocan que el procedimiento analítico no proporcione resultados en concordancia exacta para todas las muestras.

La presencia de errores aleatorios en el método analítico, lleva a la dispersión de los puntos alrededor de la línea recta y a una desviación ligera de la pendiente y del intercepto calculados (unidad y cero, respectivamente).

Para conocer si los valores de la pendiente y del intercepto que se obtienen en forma experimental, son significativamente diferentes de los valores considerados como teóricos, se aplican pruebas de t y se establecen los límites de confianza para m y b.

1.- Hipótesis y t de student:

a) ordenada al origen

$$H_0 : b = \beta \quad (\beta = 0)$$

$$H_1 : b \neq \beta$$

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

b) Pendiente

$$H_0 : m = \gamma \quad (\gamma = 0)$$

$$H_1 : m \neq \gamma$$

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

Desviación estándar en la dirección y ($s_{y/x}$):

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

2.- Intervalos de confianza:

a) Ordenada al origen

Desviación estándar (S_b):

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

Límites de confianza:

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

b) Pendiente

Desviación estándar (S_m):

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

Límites de confianza:

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

Donde: m = Valor de la pendiente experimental

y = Valor teórico de la pendiente = 1

b = Valor experimental de la ordenada al origen

β = Valor teórico de la ordenada al origen = 0

x_i = Cantidad adicionada

S_x = Desviación estándar de las cantidades adicionadas

n = Número de determinaciones

\bar{x} = Medida de las cantidades adicionadas

\hat{y}_i = Los valores de \hat{y}_i son los puntos sobre la línea de regresión calculada y corresponden a los valores individuales de x_i . Los valores de \hat{y}_i para un valor dado de x_i , son fácilmente calculados de la ecuación de regresión

El método es lineal si m , b , r y r^2 cumplen con los siguientes criterios de aceptación.

1. - Ordenada al origen (b):

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

2. - Pendiente (m):

Si $|t_{cal}| < t_{tab}(n-2, 0.975)$ y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor

de la pendiente que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente de 1.

3. - Coeficiente de correlación (r):

Debe ser mayor o igual a 0.99.

4. - Coeficiente de determinación (r^2):

Debe de ser mayor o igual a 0.98.

II.5.4 -Exactitud del método.

La exactitud del método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y un valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de placebos adicionados con cantidades conocidas del analito.

Se determina haciendo un mínimo de 6 ensayos de placebos adicionados con el 100% de la concentración teórica. Pueden utilizarse los resultados de los porcentajes encontrados en la linealidad del método.

En el tratamiento estadístico de los resultados se determina si la media aritmética del porciento de recuperación es igual a 100%, de la siguiente forma:

Se establece la hipótesis:

$$H_0: \bar{x} = 100\%$$

$$H_1: \bar{x} \neq 100\%$$

Se determina la t de student experimental:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - 100}{S_x / (n)^{1/2}}$$

Donde: n = número de determinaciones

Sx = Desviación estándar

\bar{x} = Media de las determinaciones

Se determina el Intervalo de confianza:

$$I.C. = \bar{x} + t_{tab}(n-1, 0.975) \left[\frac{S_x}{(n)^{1/2}} \right]$$

Se determina el Coeficiente de variación (C.V.):

$$C.V. = \frac{S_x}{\bar{x}} \times 100$$

El método es exacto si:

- 1.- $|t_{cal}| \leq t_{tab}(n-2, 0.975)$ y los límites de confianza incluyen el valor de 100.
- 2.- El porcentaje recuperado se encuentra entre 97.0%- 103.0% para métodos espectrofotométricos.
- 3.- El coeficiente de variación tiene un valor menor o igual a 3.0% en el caso de métodos espectrofotométricos.

II.5.5.- Repetibilidad y Reproducibilidad del método

La repetibilidad se puede expresar como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas. Se determina analizando un mínimo de seis placebos adicionados con el 100% del analito.

Como criterio de aceptación se calcula el coeficiente de variación, el cual, debe ser $\leq 3.0\%$ para métodos espectrofotométricos.

La reproducibilidad se define como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo o diferente laboratorio. Se determina utilizando una muestra homogénea del placebo adicionados con una cantidad equivalente al 100% del analito de interés, analizando por triplicado, por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

Los resultados se tabulan de acuerdo con la tabla I

TABLA I

		ANALISTAS	
		1	2
DIA	1	Y_{111}	Y_{211}
		Y_{112}	Y_{212}
		Y_{113}	Y_{213}
	2	Y_{121}	Y_{221}
		Y_{122}	Y_{222}
		Y_{123}	Y_{223}

Donde: Y es el resultado analítico, el primer número del subíndice indica el analista(i), el segundo subíndice indica el día en que se realizó(j) y el tercer número indica el número de análisis(k).

Cálculos a realizar:

$$1) \sum Y = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + \dots + Y_{223})$$

$$2) \sum Y^2_i = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$3) \sum Y^2_j = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$4) \sum Y^2_{ij} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$5) \sum Y^2_{ijk} = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + (Y_{121})^2 + (Y_{122})^2 + (Y_{123})^2 + (Y_{211})^2 + (Y_{212})^2 + (Y_{213})^2 + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

Proceder conforme a la siguiente tabla de análisis de varianza:

TABLA II

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA					
Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F _{cal}	F _{tab} (0.05, $\frac{GL_{numerador}}{GL_{denominador}}$)
Analista (A) A _i	(i-1)	$\frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{(\sum Y_{ijk})^2}{ijk}$	$\frac{SC_A}{(i-1)}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	0.05, $\frac{(i-1)}{(j-1)}$
Día (D) D _j	(j-1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum Y_i^2}{jk}$	$\frac{SC_D}{(j-1)}$	$\frac{MC_D}{MC_{AD}}$	0.05, $\frac{(j-1)}{(i-1)(j-1)}$
Interacción analista-día (A-D) A _i -D _j	(i-1)(j-1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{\sum Y_j^2}{ik} - \frac{(\sum Y_{ijk})^2}{ijk}$	$\frac{SC_{AD}}{(i-1)(j-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$	0.05, $\frac{(i-1)(j-1)}{ij(k-1)}$
Error experimental (E) E _{ijk}	ij(k-1)	$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum Y_{ij}^2}{k}$	$\frac{SC_E}{ij(k-1)}$		

Donde: i= Número de analistas (2)

j= Número de días (2)

k= Número de analisis (3)

29

Se concluye que el método es reproducible si cumple con los siguientes criterios:

- 1- El Coeficiente de variación (C.V.) debe ser menor o igual a 3.0%
- 2- Si $F_{analista\ cal} < F_{analista\ tab}$ (g.l.a., g.l.d.; 0.05) El método analítico es reproducible por los analistas

Si $F_{dia\ cal} < F_{dia\ tab}$ (g.l.d., g.l.a.d.; 0.05) El método analítico es reproducible en distintos días por el mismo analista.

Si $F_{analista-dia\ cal} < F_{analista-dia\ tab}$ (g.l.a.d., g.l.e.; 0.05) El método analítico presenta interacción analista-día.

II.5.6.- Estabilidad de la muestra analítica.

Este parámetro permite evaluar en qué condiciones y tiempo es posible trabajar con las soluciones obtenidas durante el proceso de análisis, sin que se obtengan resultados erróneos producidos por la degradación de las mismas.

Para evaluar este parámetro se realizan tres análisis iniciales, cuyos resultados se compararán con los obtenidos sobre esas mismas muestras, después de un tiempo determinado, en diferentes condiciones de almacenamiento (por ejemplo luz blanca, oscuridad, refrigeración, etc), por un mismo analista, utilizando solución de referencia recién preparada, para cada condición.

Los resultados se tabulan de acuerdo a la tabla III

TABLA III

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

⋮
⋮
⋮

⋮
⋮
⋮

⋮
⋮
⋮

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

$$I_{13} = \frac{Y_{13}}{Y_F} \times 100$$

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

Calculo de la media del Factor (I) para condición/tiempo:

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

Donde N es el número de muestras para cada condición tiempo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Criterios de aceptación:

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

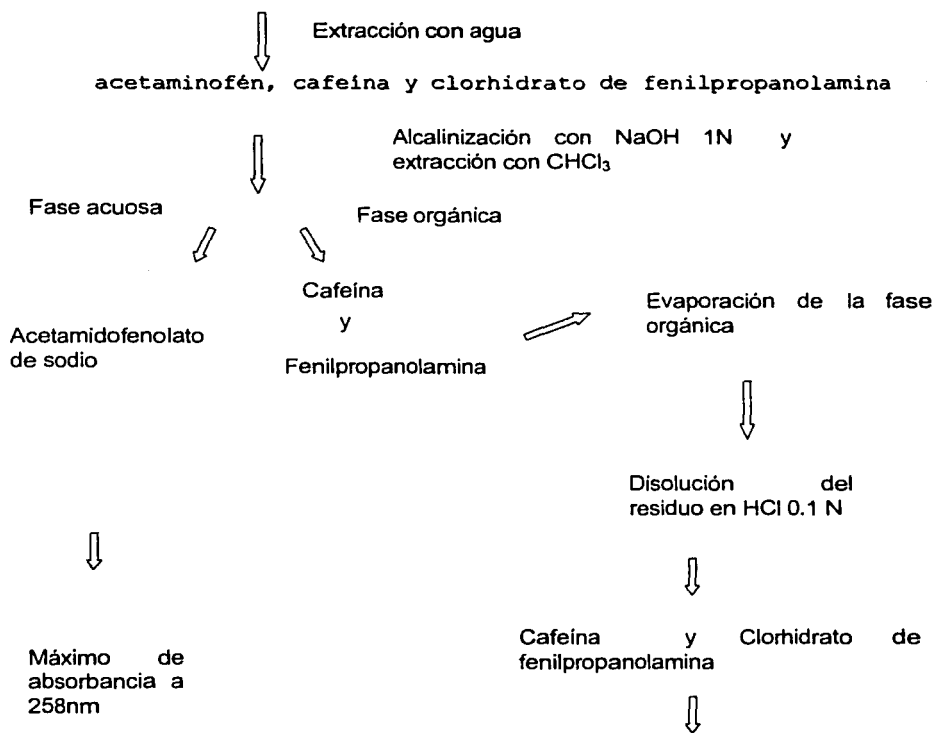
III PARTE EXPERIMENTAL

Los métodos desarrollados para la cuantificación del acetaminofén y de cafeína en unas tabletas que además contienen clorhidrato de fenilpropanolamina se basan principalmente en aprovechar las diferencias de propiedades ácido base, de coeficientes de distribución y de las longitudes de onda de máxima absorbancia de cada fármaco.

A continuación se muestra la formulación y un diagrama del método^{7,12,13}:

Acetaminofén		0.500 g	
Cafeína		0.020 g	
Clorhidrato	de	fenilpropanolamina	0.015 g
Exipiente c.b.p			1 tableta

DIAGRAMA :



A pesar de quedar en la misma solución los dos principios activos, en las condiciones de trabajo y a la longitud de onda donde la cafeína muestra su máximo de absorción (273 nm), el clorhidrato de fenilpropranolamina, no interfiere; (ésto quedará demostrado en la especificidad del método para la cafeína).

III.1.0- METODO ANALITICO PARA LA VALORACION DE ACETAMINOFEN

III.1.1-REACTIVOS:

a) Cloroformo R.A:

b) Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 1N

c) Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 0.01N

III.1.2-PREPARACION DE LA SOLUCION DE REFERENCIA:

Transferir cerca de 0.031 g de acetaminofén, sustancia de referencia, exactamente pesados, a un matraz volumétrico de 25 mL, agregar 20 mL de agua destilada y 0.50 mL de solución de hidróxido de sodio 1N, agitar durante una hora en un agitador mecánico. Transcurrido el tiempo, llevar al aforo con agua destilada y mezclar. Transferir 1.0 mL de la solución obtenida a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con solución de hidróxido de sodio 0.01N y mezclar.

III.1.3-PREPARACION DE LA SOLUCION PROBLEMA:

Pulverizar finamente 20 tabletas y pesar con exactitud una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 0.620 g de acetaminofén (cerca de 0.87 g). Transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 80 mL de agua destilada y agitar durante una hora, colocando

el matraz en un agitador mecánico. Llevar al aforo con agua destilada y mezclar. Filtrar a través de papel filtro, desechando los primeros mililitros del filtrado, tomar una alícuota de 20.0 mL de la Solución filtrada y transferirla a un embudo de separación. Agregar 10 mL de agua destilada y 2.0 mL de Solución de hidróxido de sodio 1N; mezclar el contenido del embudo y extraer con tres porciones sucesivas de 15 mL de cloroformo, cada una. Reunir los extractos clorofórmicos, conservándolos para efectuar la valoración de cafeína.

Transferir la fase acuosa alcalina a un matraz volumétrico de 100 mL; enjuagar el embudo con dos porciones de 20 mL, cada una, de agua destilada y reunir las con el extracto acuoso alcalino. Llevar al aforo con agua destilada y mezclar. Filtrar a través de papel filtro para eliminar la opalescencia. Desechar los primeros mililitros del filtrado y transferir 1.0 mL de la solución filtrada a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con solución de hidróxido de sodio 0.01N y mezclar.

III.1.4-PROCEDIMIENTO:

Determinar las absorbancias de la solución de referencia y de la solución problema, en un espectrofotómetro adecuado, a la longitud de onda de máxima absorbancia (258 nm), utilizando solución de hidróxido de sodio 0.01N como blanco de referencia.

III.1.5-CALCULOS

a) Para calcular la cantidad, expresada en gramos, de acetaminofén/tableta,

aplicar la siguiente formula:

$$\text{g de acetaminofén/tableta} = \frac{\frac{A_p}{A_{REF}} \times C \times FD \times (P.P.)}{M}$$

En donde:

A_p = absorbancia de la solución problema

A_{REF} = absorbancia de la solución de referencia

C = concentración de la solución de referencia,
expresada en g/mL

(P.P) = peso promedio de las tabletas, expresado en g

M = muestra utilizada, expresada en g

FD = Factor de dilución = 50000

b) Para calcular a partir del dato obtenido, el porcentaje de acetaminofén, con

respecto a la concentración indicada en el marbete, aplicar la siguiente fórmula:

$$\% \text{Acetaminofén} = \frac{Y \times 100}{0.5}$$

En donde Y = g de Acetaminofén/Tableta, encontrados

III.2.0- METODO ANALITICO PARA LA VALORACION DE CAFEINA

III.2.1-REACTIVOS:

- a) Cloroformo R.A:
- b) Solución de ácido clorhídrico aproximadamente 0.1N
- c) Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 0.1N
- d) Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 1N

III.2.2-PREPARACION DE LA SOLUCION DE REFERENCIA

Transferir cerca de 0.0250 g de cafeína, sustancia de referencia, exactamente pesados, a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de la solución de ácido clorhídrico 0.1N, agitar hasta disolución, llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Transferir 1.0 mL de la solución a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con solución de ácido clorhídrico 0.1N y mezclar.

III.2.3-PREPARACION DE LA SOLUCION PROBLEMA

Reunir los extractos clorofórmicos obtenidos como se indica en el procedimiento descrito para la valoración de acetaminofén en un matraz volumétrico de 50 mL, llevar al aforo con cloroformo y mezclar.

Transferir una alícuota de 5.0 mL de la solución cloroformica obtenida, a un matraz volumétrico de 100 mL, evaporar el cloroformo colocando el matraz en una placa caliente y después, aplicar vacío en la boca del matraz para eliminar totalmente los vapores de cloroformo. Agregar 80 mL de solución de ácido clorhídrico 0.1N y agitar durante 10 minutos, colocando el matraz en el agitador mecánico. Transcurrido el tiempo, llevar al aforo con solución de ácido clorhídrico 0.1N y mezclar el contenido del matraz. Filtrar la solución a través de papel filtro, para eliminar opalescencia, desechando los primeros mililitros del filtrado.

III.2.4-PROCEDIMIENTO:

Determinar las absorbancias de la solución de referencia y de la solución problema, a la longitud de máxima absorbancia (272 nm), utilizando solución de ácido clorhídrico 0.1N como blanco de referencia.

III.2.5-CALCULOS:

a) Para calcular la cantidad, expresada en gramos, de cafeína/tableta, aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{g de cafeína/tableta} = \frac{A_p}{A_{REF}} \times C \times F \times D \times (P.P.)$$

M

En donde:

A_p = absorbancia de la solución problema

A_{REF} = absorbancia de la solución de referencia

c = concentración de la solución de referencia,
expresada en g/mL

(P.P) = peso promedio de las tabletas, expresado en g

M = muestra utilizada, expresada en g

FD = Factor de dilución = 5000

b) Para calcular, a partir del dato obtenido, el porcentaje de cafeína, con respecto a la concentración indicada en el marbete, aplicar la siguiente fórmula:

$$\% \text{cafeína} = \frac{Y \times 100}{0.02}$$

En donde Y = g de cafeína/Tableta, encontrados

IV- VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS

Para validar los métodos analíticos, como indicativos de control de calidad se evaluaron los siguientes parámetros:

IV.1.0-ESPECIFICIDAD

IV.1.1-Acetaminofén: Con el objeto de comprobar la especificidad del método, se determinó la espectroscopia U.V. (210nm - 280nm) de las soluciones obtenidas después de aplicar el método en las siguientes muestras:

- 1- Placebo cargado al 100% con todos los componentes de la formulación, excepto acetaminofén.
- 2- Placebo cargado al 100% con todos los componentes de la formulación.
- 3- Solución de la sustancia de referencia (100%).

IV.1.2- Cafeína: Con el objeto de comprobar la especificidad del método, se determinó la espectroscopia U.V. (245nm - 295nm) de las soluciones obtenidas después de aplicar el método en las siguientes muestras:

- 1- Placebo cargado al 100% con todos los componentes de la formulación, excepto cafeína.
- 2- Placebo cargado al 100% con todos los componentes de la formulación.
- 3- Solución de la sustancia de referencia (100%).

IV.2.0- LINEALIDAD DEL SISTEMA

IV.2.1- Acetaminofén: Se prepararon soluciones con acetaminofén, sustancia de referencia, en concentraciones correspondientes al 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, partiendo de una solución inicial. Estos análisis se hicieron por triplicado para cada concentración.

IV.2.2- Cafeína: Se prepararon soluciones con cafeína, sustancia de referencia, en concentraciones correspondientes al 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, partiendo de una solución inicial. Estos análisis se hicieron por triplicado para cada concentración.

IV.3.0-REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

IV.3.1- Acetaminofén: Se realizó analizando por sextuplicado una misma solución con acetaminofén sustancia de referencia, en concentración correspondiente al 100%.

IV.3.2- Cafeína: Se realizó analizando por sextuplicado una misma solución con cafeína sustancia de referencia, en concentración correspondiente al 100%.

IV.4.0-LINEALIDAD DEL METODO

IV.4.1-Acetaminofén: Se determinó a partir de placebos adicionados en concentraciones de 80%, 100% y 120% de la cantidad indicada en el marbete, preparados de manera independiente y analizados por triplicado.

IV.4.2- Cafeína: Se determinó a partir de placebos adicionados en concentraciones de 80%, 100% y 120% de la cantidad indicada en el marbete, preparados de manera independiente y analizados por triplicado.

IV.5.0-EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100% DEL METODO

IV.5.1- Acetaminofén: Se evaluó analizando por sextuplicado, un placebo cargado, en concentración correspondiente al 100%.

IV.5.2- Cafeína: : Se evaluó analizando por sextuplicado, un placebo cargado, en concentración correspondiente al 100%.

IV.6.0-REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

IV.6.1- Acetaminofén: Dos analistas efectuaron el análisis por triplicado en dos días diferentes sobre muestras de un placebo cargado al 100%, de la cantidad expresada en el marbete.

IV.6.2- Cafeína: Dos analistas efectuaron el análisis por triplicado en dos días diferentes sobre muestras de un placebo cargado al 100%, de la cantidad expresada en el marbete.

IV.7.0-ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS ANALITICAS

IV.7.1- Acetaminofén: Este parámetro se evaluó analizando una muestra de un placebo cargado al 100% de lo expresado en el marbete, almacenando la solución final en tres condiciones diferentes y durante tres diferentes tiempos.

Se realizaron análisis por triplicado en tiempo cero (análisis inicial) y después de 3,6 y 24 horas, en diferentes condiciones de almacenamiento: temperatura ambiente, refrigeración y oscuridad.

IV.7.2- Cafeína: Este parámetro se evaluó analizando una muestra de un placebo cargado al 100% de lo expresado en el marbete, almacenando la solución final en tres condiciones diferentes y durante tres diferentes tiempos.

Se realizaron análisis por triplicado en tiempo cero (análisis inicial) y después de 3,6 y 24 horas, en diferentes condiciones de almacenamiento: temperatura ambiente, refrigeración y oscuridad.

V- RESULTADOS

V.1.0-ESPECIFICIDAD

V.1.1.- Acetaminofén: En las figuras 1, 2 y 3 se presentan los espectros de absorción de las muestras analizadas para evaluar este parámetro.

La figura 1 corresponde al análisis de una muestra del placebo, que contiene todos los componentes de la formulación, excepto acetaminofén. Como se puede observar, no presenta absorbancia, lo cual significa que no hay interferencia de los demás componentes de la formulación.

Las figuras 2 y 3 corresponden al análisis de la muestra del placebo cargado al 100% y de la solución de la sustancia de referencia (100%), respectivamente. En ambos espectrogramas, se observa un máximo de absorbancia a la longitud de onda de 256 nm, con un valor de absorbancia cercano, el cual, corresponde al acetaminofén (como p-acetamidofenolato de sodio).

Por lo antes expuesto, se puede concluir que el método de análisis propuesto para determinar acetaminofén en las tabletas en estudio, es específico.

FIGURA No 1

Placebo con todos los componentes de la formulación, excepto acetaminofén

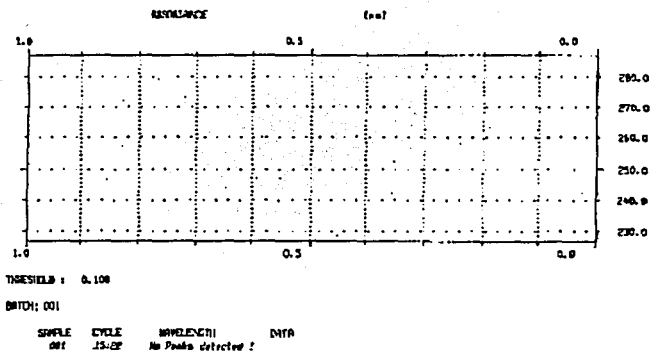


FIGURA No 2

Placebo cargado al 100%, con todos los componentes de la formulación

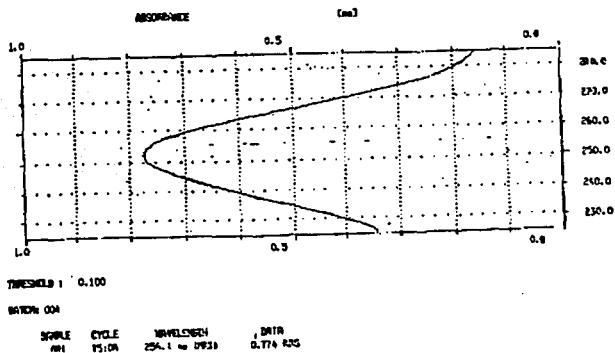
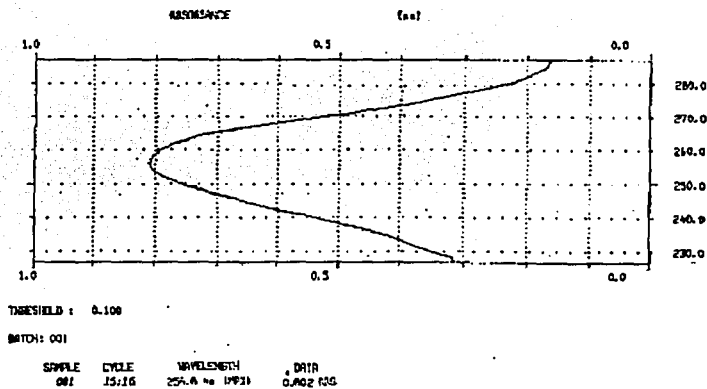


FIGURA No 3

Solución de referencia (100%)



V.1.2 -Cafeína: : En las figuras 4, 5 y 6 se presentan los espectros de absorción de las muestras analizadas para evaluar este parámetro.

La figura 4 corresponde al análisis de una muestra del placebo, que contiene todos los componentes de la formulación, excepto cafeína. Como se puede observar, la absorbancia a 273 nm es despreciable, lo cual significa que no hay interferencia de los demás componentes de la formulación.

Las figuras 5 y 6 corresponden al análisis de la muestra del placebo cargado al 100% y de la solución de la sustancia de referencia (100%), respectivamente. En ambos espectrogramas, se observa un máximo de absorbancia a la longitud de onda cercana a 273

nm, con un valor de absorbancia cercana, el cual, corresponde a la cafeína.

Por lo antes expuesto, se puede concluir que el método de análisis propuesto para determinar cafeína, en las tabletas en estudio, es específico.

FIGURA No 4

Placebo con todos los componentes de la formulación, excepto cafeína

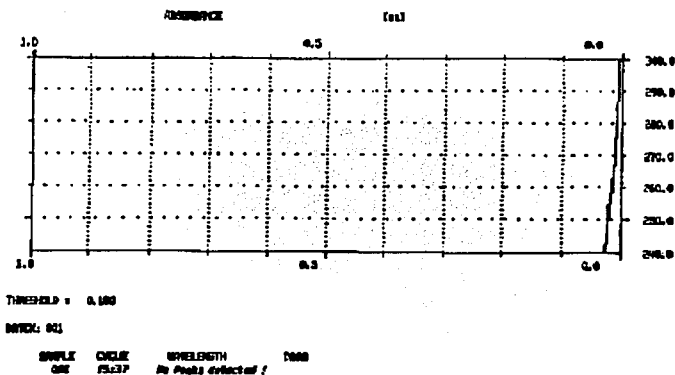


FIGURA No 5

Placebo cargado al 100%, con todos los componentes de la formulación

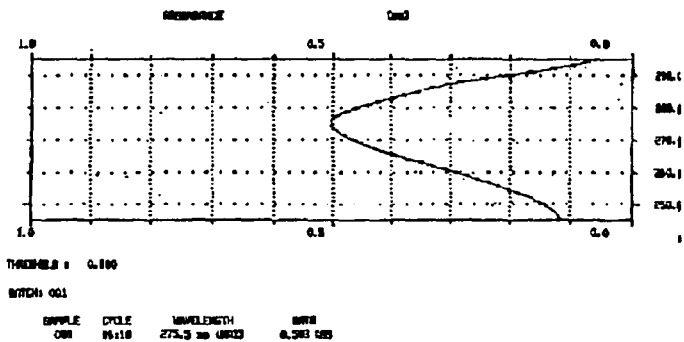
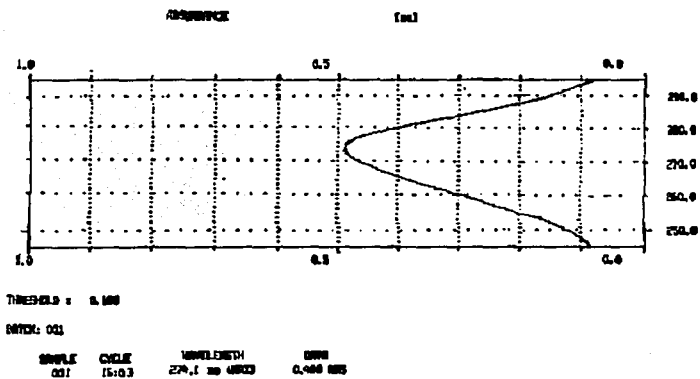


FIGURA No 6

Solución de referencia (100%)



V.2.0-LINEALIDAD DEL SISTEMA.

V.2.1- Acetaminofén: En la tabla No. 1 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de linealidad; la tabla No 2 nos proporciona los datos de regresión lineal, calculados a partir de los promedios de las determinaciones realizadas. La gráfica No 1 representa la cantidad adicionada contra la absorbancia; se observa la tendencia lineal del sistema de medición.

Nota.-La cantidad adicionada que se indica, se refiere a las concentraciones expresadas en mg/mL de las soluciones finales, obtenidas después de efectuar las diluciones correspondientes. Esta nota es aplicable a todos los casos en los que se señalan cantidades a nivel de mg/mL.

TABLA No 1

% CONCENTRACION	CANTIDAD ADICIONADA mg/mL	ABSORBANCIA A 256 nm
80	9.84	0.694
	9.84	0.697
	9.84	0.694
90	11.07	0.799
	11.07	0.805
	11.07	0.794
100	12.30	0.903
	12.30	0.890
	12.30	0.889
110	13.53	0.971
	13.53	0.982
	13.53	0.977
120	14.76	1.053
	14.76	1.059
	14.76	1.058

TABLA No 2

PROMEDIO DE CANTIDAD ADICIONADA mg/mL	PROMEDIO DE ABSORBANCIAS A 256 nm	REGRESION LINEAL
9.84	0.695	$r^2=0.9968$
11.07	0.799	
12.30	0.894	$r=0.9984$
13.53	0.977	
14.76	1.057	C.V.= 1.13%

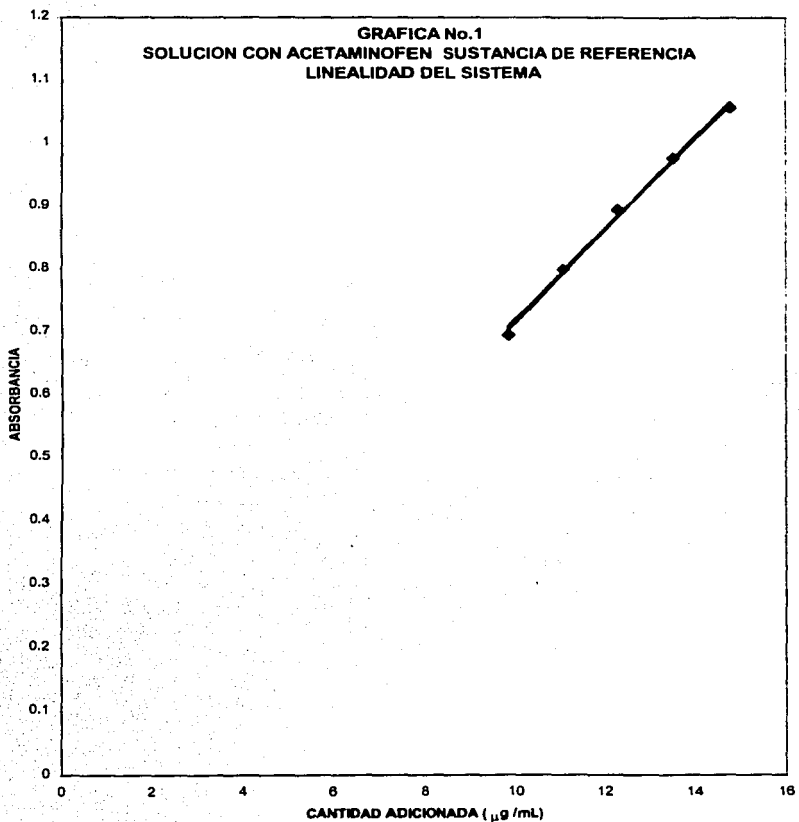
A continuación se analizarán los resultados:

a) Coeficiente de correlación lineal(r): Cumple con el criterio de aceptación de ser \geq a 0.99, existiendo una relación lineal entre la cantidad adicionada y la absorbancia determinada a 256 nm.

b) Coeficiente de determinación (r^2): cumple con los criterios de aceptación, dado que $r^2 \geq 0.98$

c) Coeficiente de variación (C.V.): cumple con el criterio para la precisión del sistema, al ser menor a 1.5%.

Se concluye que el sistema de medición es lineal.



V.2.2- Cafeína: En la tabla No. 3 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de linealidad del sistema para la cafeína; la tabla No 4 nos proporciona los datos de regresión lineal calculados a partir de los promedios de las determinaciones realizadas. La gráfica No 2 representa la cantidad adicionada contra la absorbancia; se observa la tendencia lineal del sistema de medición.

TABLA No 3

CONCENTRACION	CANTIDAD ADICIONADA mg/mL	ABSORBANCIA A 273 nm
80	4.00	0.220
	4.00	0.217
	4.00	0.219
90	4.50	0.240
	4.50	0.240
	4.50	0.242
100	5.00	0.264
	5.00	0.266
	5.00	0.265
110	5.50	0.290
	5.50	0.289
	5.50	0.290
120	6.00	0.316
	6.00	0.320
	6.00	0.317

TABLA No 4

PROMEDIO DE CANTIDAD ADICIONADA mg/mL	PROMEDIO DE ABSORBANCIAS A 273 nm	REGRESION LINEAL
4.00	0.219	r= 0.9990
4.50	0.241	
5.00	0.265	r ² = 0.9980
5.50	0.290	
6.00	0.318	C.V.= 1.44%

A continuación se analizarán los resultados:

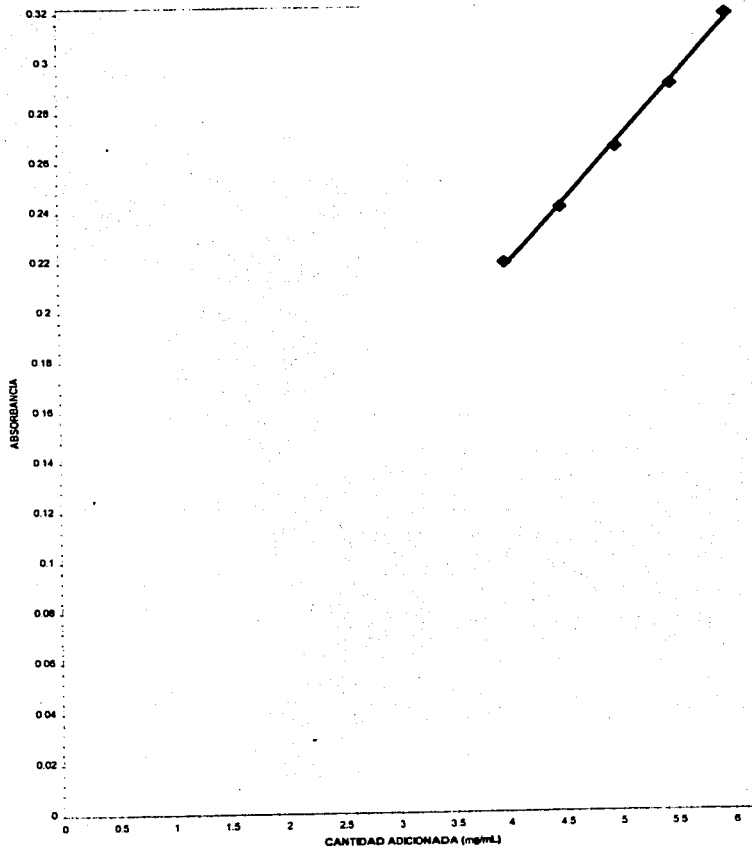
d) Coeficiente de correlación lineal(r): Cumple con el criterio de aceptación de ser \geq a 0.99, existiendo una relación lineal entre la cantidad adicionada y la absorbancia determinada a 273 nm.

e) Coeficiente de determinación (r^2): cumple con los criterios de aceptación, dado que $r^2 \geq 0.98$

f) Coeficiente de variación (C.V.): cumple con el criterio para la precisión del sistema, al ser menor a 1.5%.

Se concluye que el sistema de medición es lineal.

GRAFICA No 2
SOLUCION CON CAFEINA SUSTANCIA DE REFERENCIA
LINEALIDAD DE SISTEMA



V.3.0-REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

V.3.1- Acetaminofén: La tabla No 5 muestra los resultados obtenidos para la evaluación de este parámetro.

TABLA No 5

CANTIDAD ADICIONADA (mg/mL)	ABSORBANCIA A 256 nm	
12.30	0.903	n=6
12.30	0.890	—
12.30	0.889	x = 0.891
12.30	0.888	Sx=0.0060
12.30	0.886	C.V.= 0.67%
12.30	0.891	

Se concluye que el sistema de medición es repetible ya que el C.V. obtenido en forma experimental es menor de 1.5%

5.3.2- Cafeína: La tabla No 6 muestra los resultados obtenidos para la evaluación de este parámetro.

TABLA No 6

CANTIDAD ADICIONADA (mg/mL)	ABSORBANCIA A 273 nm	
5.04	0.264	n=6
5.04	0.266	—
5.04	0.265	x= 0.265
5.04	0.266	Sx=0.0014
5.04	0.263	C.V.= 0.52%
5.04	0.263	

Se concluye que el sistema de medición es repetible ya que el C.V. obtenido en forma experimental es menor de 1.5%

V.4.0- LINEALIDAD DEL METODO

V.4.1-Acetaminofén: La tabla No 7 muestra los resultados obtenidos para la evaluación de este parámetro. En la gráfica 3 se representan estos datos (cantidad adicionada y cantidad recuperada) observándose tendencia lineal

TABLA No 7

% DE CONCENTRACION	CANTIDAD ADICIONADA (mg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg/mL)	PROMEDIO DE CANTIDAD RECUPERADA (mg/mL)
80	9.84	9.78	9.79
		9.79	
		9.81	
100	12.30	12.30	12.27
		12.25	
		12.26	
120	14.76	14.79	14.80
		14.86	
		14.76	

En la tabla No 8 se presentan los resultados correspondientes a la prueba "t de student", aplicada a la pendiente y a la ordenada al origen, además de los resultados de regresión lineal

TABLA No 8

REGRESION LINEAL	ORDENADA AL ORIGEN	PENDIENTE
m=1.0183	$t_{cal} = -3.2593$	$t_{cal} = 3.1193$
b=-0.2383	$t_{tab} (1,0.975)=12.706$	$t_{tab} (1,0.975)= 12.706$
$r^2=0.9998$	I.C.= -0.2383 ± 0.9290	I.C.= 1.0183 ± 0.0745
r=0.9999	LS= 0.6907	LS= 1.0928
	LI=-1.1673	LI= 0.9438

A continuación se analizarán los resultados:

a) Ordenada al origen(b): Dado que $|t_{cal}| < t_{tab}(1,0.975)$ y los límites de confianza incluyen el valor de cero, entonces se acepta H_0 (ver página 21) y se concluye que el valor experimental obtenido de la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero.

b) Pendiente(m): Dado que $|t_{cal}| < t_{tab}(1,0.975)$ y los límites de confianza incluyen el valor de uno, entonces se acepta H_0 (ver página 21) y se concluye que el valor experimental obtenido de la pendiente no es significativamente diferente de uno.

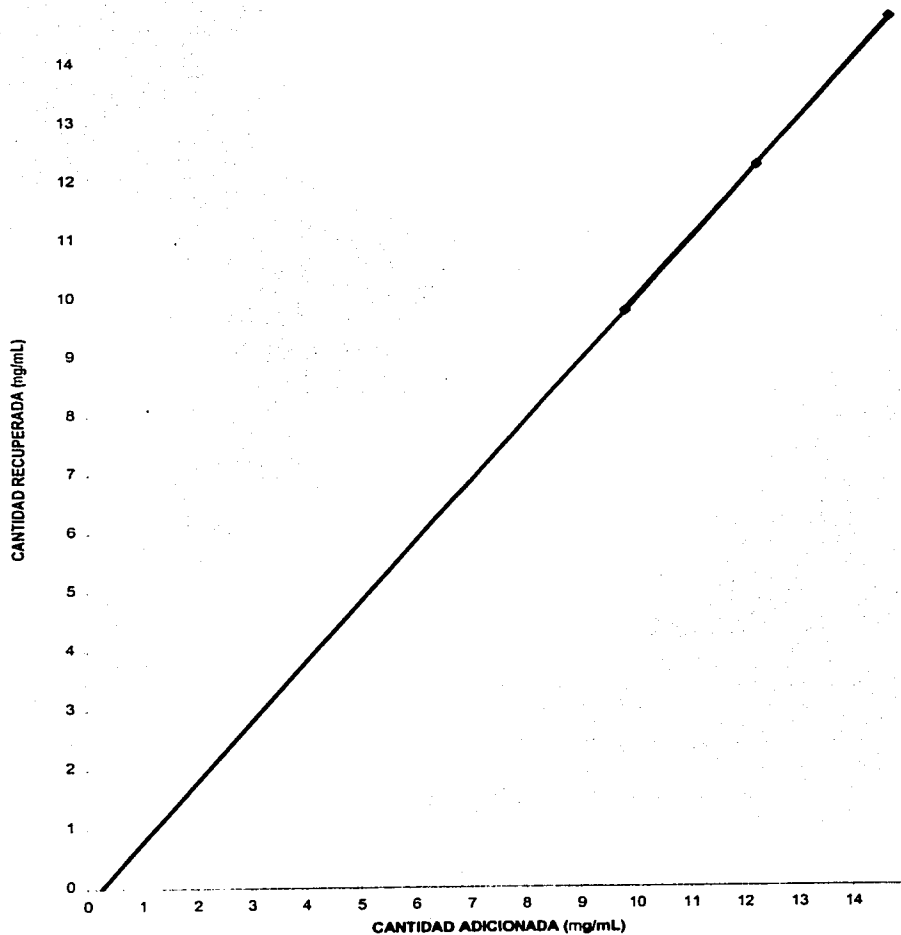
c) Coeficiente de correlación lineal(r): Cumple con el criterio de aceptación de ser \geq a 0.99, existiendo una relación

lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, por lo que se asegura que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración

d) Coeficiente de determinación (r^2): cumple con los criterios de aceptación, dado que $r^2 \geq 0.98$

Se concluye que el método de análisis es lineal.

GRAFICA No 3
ACETAMINOFEN
LINEALIDAD DEL METODO



V.4.2-Cafeína: La tabla No 9 muestra los resultados obtenidos para la evaluación de este parámetro. En la gráfica 4 se representan estos datos (cantidad adicionada y cantidad recuperada) observándose tendencia lineal

TABLA No.9

¿ DE CONCENTRACION	CANTIDAD ADICIONADA (mg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg/mL)	PROMEDIO DE CANTIDAD RECUPERADA (mg/mL)
80	4.00	3.97	3.98
		3.98	
		3.98	
100	5.00	4.90	5.01
		5.04	
		5.08	
120	6.00	6.06	6.06
		6.06	
		6.06	

En la tabla No 10 se presentan los resultados correspondientes a la prueba "t de student", aplicada a la pendiente y a la ordenada al origen, además de los resultados de regresión lineal

TABLA No. 10

REGRESION LINEAL	ORDENADA AL ORIGEN	PENDIENTE
m=1.0400	$t_{cal} = -3.6660$	$t_{..} = 6.9281$
b=-0.1833	$t_{tab} (1,0.975)=12.706$	$t_{tab} (1,0.975)= 12.706$
$r^2=0.9998$	I.C. = -0.1833 ± 0.6353	I.C. = 1.0400 ± 0.0733
r=0.9999	LS= 0.4520	LS= 1.1133
	LI= -0.8186	LI= 0.9667

A continuación se analizarán los resultados:

a) Ordenada al origen(b): Dado que $|t_{cal}| < t_{tab}(1,0.975)$ y los límites de confianza incluyen el valor de cero, entonces se acepta H_0 (ver página 21) y se concluye que el valor experimental obtenido de la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero.

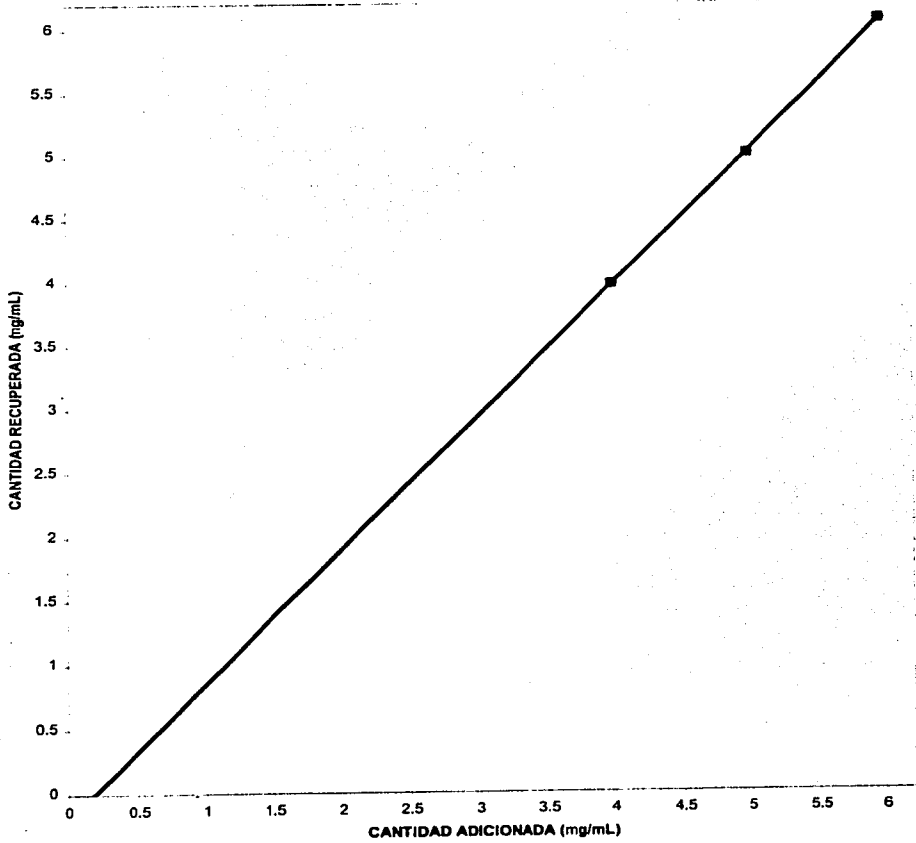
b) Pendiente(m): Dado que $|t_{cal}| < t_{tab}(1,0.975)$ y los límites de confianza incluyen el valor de uno, entonces se acepta H_0 (ver página 21) y se concluye que el valor experimental obtenido de la pendiente no es significativamente diferente de uno.

c) Coeficiente de correlación lineal(r): Cumple con el criterio de aceptación de ser \geq a 0.99, existiendo una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, por lo que se asegura que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración

d) Coeficiente de determinación (r^2): cumple con los criterios de aceptación, dado que $r^2 \geq 0.98$

Se concluye que el método de análisis es lineal.

GRAFICA No 4
CAFEINA
LINEALIDAD DEL METODO



V.5.0- EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100% DEL METODO

V.5.1- Acetaminofén: En la tabla No 11, se presentan los resultados obtenidos para evaluar estos parámetros.

TABLA No 11

CANTIDAD ADICIONADA (mg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg/mL)	PORCENTAJE DE RECUPERACION ENCONTRADO
12.23	12.30	100.57
12.23	12.40	101.39
12.23	12.30	100.57
12.23	12.23	100.00
12.23	12.18	99.59
12.23	12.19	99.67

$n=6$

media= 100.30 %

$S_x = 0.6819$

$C.V = 0.68\%$

$t_{cal} = -1.0776$

$t_{tab}(5, 0.975) = 2.57$

Intervalo de confianza del % recuperado

I.C. = 100.30 ± 0.7154

Límite superior: 101.01%

Límite inferior: 99.58%

El método es exacto y repetible ya que:

a) $|t_{cal}| < t_{tab}(5, 0.975)$

- b) Los límites de confianza incluyen el valor de 100
- c) Se acepta H_0 (ver página 24) y se concluye que la media obtenida en forma experimental no es significativamente diferente de 100
- d) El C.V es menor a 3.0%

V.5.2- Cafeína: En la tabla No 12 se presentan los resultados obtenidos para evaluar estos parámetros.

TABLA No 12

CANTIDAD ADICIONADA (mg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg/mL)	PORCENTAJE DE RECUPERACION ENCONTRADO
5.10	5.00	98.04
5.10	5.14	100.78
5.10	5.18	101.57
5.10	5.20	101.96
5.10	5.18	101.57
5.10	5.18	101.57

$n=6$

media= 100.91 %

$S_x= 1.4603$

C.V= 1.45%

$t_{cal}=-1.5264$

$t_{tab}(5, 0.975)=2.57$

Intervalo de confianza del % recuperado

I.C. = 100.91 \pm 1.5321

Límite superior: 102.44%

Límite inferior: 99.38%

El método es exacto y repetible, ya que:

- a) $|t_{cal}| < t_{tab}(5, 0.975)$
- b) Los límites de confianza incluyen el valor de 100
- c) Se acepta H_0 (ver página 24) y se concluye que la media obtenida en forma experimental no es significativamente diferente de 100
- d) El C.V es menor a 3.0%

V.6.0- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

V.6.1- Acetaminofén: Los resultados obtenidos para evaluar este parámetro se muestran en la tabla No 13

TABLA No 13

DIA (D)	PORCENTAJE RECUPERADO	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	100.57	100.34
	101.39	100.52
	100.57	99.97
2	100.00	101.02
	99.57	99.96
	99.66	100.07

En la tabla No 14 se resumen los resultados obtenidos del análisis de varianza (ver página 29)

TABLA No 14

FV	GL	SC	MC	F _{cal}	F _{tab}
A(i)	1	0.02340833	0.02340833	0.0290423	161
Dj(i)	1	1.82101667	1.82101667	2.25930253	161
A-D	1	0.80600833	0.80600833	4.1552176	5.32
E(i,j)k	8	1.5518	0.193975		

Análisis de resultados:

a) Como $F_{a \text{ cal}} < F_{a \text{ tab}}$, se concluye que el método es reproducible con distintos analistas

b) Como $F_{d \text{ cal}} < F_{d \text{ tab}}$, se concluye que el método es reproducible en distintos días por un mismo analista

c) Como $F_{ad \text{ cal}} < F_{ad \text{ tab}}$, se concluye que el método es reproducible en distintos días con diferentes analistas.

Por lo tanto se concluye que el método es reproducible.

V.6.2- Cafeína: Los resultados obtenidos para evaluar este parámetro, se muestran en la tabla No 15

TABLA No 15

DIA (D)	PORCENTAJE RECUPERADO	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	98.04	100.79
	100.78	101.02
	101.57	100.62
2	101.99	100.96
	101.59	100.95
	101.59	100.43

En la tabla No 16 se resumen los resultados obtenidos del análisis de varianza (ver página 29)

TABLA No 16

FV	GL	SC	MC	FCAL	FTAB
A(i)	1	0.05200833	0.05200833	0.02631457	161
Dj(i)	1	3.80941667	3.80941667	1.92744414	161
A-D	1	1.97640833	1.97640833	2.18530531	5.32
E(i,j)k	8	7.23526667	0.90440833		

Análisis de resultados:

- a) Como $F_a \text{ cal} < F_a \text{ tab}$, se concluye que el método es reproducible con distintos analistas

b) Como $F_{d\text{ cal}} < F_{d\text{ tab}}$, se concluye que el método es reproducible en distintos días por un mismo analista

c) Como $F_{ad\text{ cal}} < F_{ad\text{ tab}}$, se concluye que el método es reproducible en distintos días con diferentes analistas.

Por lo tanto se concluye que el método es reproducible.

V.7.0- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

V.7.1- Acetaminofén: en la tabla No 17 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de este parámetro.

Se manejaron las siguientes condiciones:

-Temperatura ambiente

-Refrigeración

-Oscuridad

-Durante 3, 6 y 24 horas.

TABLA No 17

TIEMPO (h)	PORCENTAJE RECUPERADO		
	TEMPERATURA AMBIENTE	REFRIGERACION	OSCURIDAD
0	99.50	100.30	99.50
	99.30	100.00	99.30
	99.91	99.70	99.91
3	100.50	100.30	99.60
	100.20	100.80	99.30
	100.35	100.70	99.81
6	98.60	100.10	98.90
	98.90	100.50	98.40
	99.14	100.30	99.10
24	100.70	101.00	100.70
	100.30	101.40	100.40
	101.22	101.62	101.12

En la tabla No 18 se presentan los valores de la media del factor I, calculada para cada caso

TABLA No 18

TIEMPO (h)	MEDIA DEL FACTOR I (%)		
	TEMPERATURA AMBIENTE	REFRIGERACION	OSCURIDAD
3	100.78	100.60	100.00
6	99.30	100.30	99.23
24	101.17	101.34	101.17

Como se observa, ningún valor de la media del factor I se encuentra fuera del intervalo de 97.0 - 103.0 %, por lo que se concluye que las soluciones son estables en las condiciones y tiempos mencionados.

V.7.2- Cafeína: en la tabla No 19 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de este parámetro.

Se manejaron las siguientes condiciones:

- Temperatura ambiente
- Refrigeración
- Oscuridad
- Durante 3, 6 y 24 horas.

TABLA No 19

TIEMPO (h)	PORCENTAJE RECUPERADO		
	TEMPERATURA AMBIENTE	REFRIGERACION	OSCURIDAD
0	99.50	100.30	99.50
	99.30	100.00	99.30
	99.91	99.70	99.91
3	100.50	100.30	99.60
	100.20	100.80	99.30
	100.35	100.70	99.81
6	98.60	100.10	98.90
	98.90	100.50	98.40
	99.14	100.30	99.10
24	100.70	101.00	100.70
	100.30	101.40	100.40
	101.22	101.62	101.12

En la tabla No 20 se presentan los valores de la media del factor I, calculada para cada caso

TABLA No 20

TIEMPO (h)	MEDIA DEL FACTOR I (%)		
	TEMPERATURA AMBIENTE	REFRIGERACION	OSCURIDAD
3	100.78	100.60	100.00
6	99.30	100.30	99.23
24	101.17	101.34	101.17

Como se observa, ningún valor de la media del factor I se encuentra fuera del intervalo de 97.0 - 103.0 %, por lo que se concluye que las soluciones son estables en las condiciones y tiempos mencionados.

VI.- CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados en la validación de los métodos analíticos desarrollados para cuantificar acetaminofén y cafeína en unas tabletas que además contienen clorhidrato de fenilpropanolamina, se concluye lo siguiente:

- 1) Los métodos son específicos, la respuesta es debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la formulación.

En el caso del acetaminofén, ésto se demuestra con el espectrograma obtenido al aplicar el método en un placebo cargado con todos los componentes de la formulación, excepto el acetaminofén, ya que no muestra ninguna señal a lo largo de todo el intervalo de longitudes de onda en que se trabajó, el cual por supuesto, incluye la longitud de onda a la que se efectúa el análisis (256nm).

Por otra parte, este planteamiento es apoyado al observar los espectogramas correspondientes al placebo cargado al 100% y al de la solución de la sustancia de referencia (100%), ambas gráficas fueron semejantes corroborándose que la respuesta fue debida únicamente al acetaminofén.

Con respecto a la Cafeína, se comprobó que el método es específico a pesar de que al aplicar el procedimiento analítico

que se propone, no se logra separar la cafeína del clorhidrato de fenilpropanolamina. La especificidad se demuestra con el espectrograma obtenido al aplicar el método en un placebo cargado con todos los componentes de la formulación, excepto la cafeína, donde se observa que la señal es despreciable a lo largo de todo el intervalo de longitudes de onda en que se trabajó, el cual por supuesto, incluye la longitud de onda a la que se efectúa el análisis (273nm).

Por otra parte, este planteamiento es apoyado al observar los espectrogramas correspondientes al placebo cargado al 100% y al de la solución de la sustancia de referencia (100%); ambas gráficas fueron semejantes corroborándose que la respuesta fue debida únicamente a la Cafeína.

- 2) Tanto para el acetaminofén como para la cafeína, los sistemas de medición son lineales en los intervalos de concentración comprendidos entre 80% y 120%, porque cumplen con los criterios de aceptación. Las gráficas 1 y 2 muestran una clara tendencia lineal, que queda demostrada con el cálculo de r y r^2 , los cuales fueron mayores de 0.99 y 0.98, respectivamente.
- 3) Tanto para el acetaminofén como para la cafeína, los sistemas de medición son repetibles, puesto que en ambos casos, el C.V. resultó menor de 1.5%, que es el criterio de aceptación para este parámetro.

- 4) Tanto para el acetaminofén como para la cafeína, los métodos propuestos son lineales en los intervalos de concentración comprendidos entre 80% y 120%, pues cumplen con los criterios de aceptación. Las gráficas 3 y 4 muestran una clara tendencia lineal, que queda demostrada con el cálculo de r y r^2 , los cuales fueron mayores de 0.99 y 0.98 respectivamente. El análisis t de student, aplicado a la pendiente, demostró que la cantidad de fármaco adicionado (tanto en el caso del acetaminofén, como el de la cafeína), es directamente proporcional a la cantidad recuperada, al no ser significativamente diferente de 1. La ordenada al origen también fue evaluada por la t de student, resultando en ambos casos no significativamente diferente de cero.
- 5) Tanto para el acetaminofén como para la cafeína, los métodos propuestos son exactos y repetibles al 100%, ya que el análisis t de student demostró que la media obtenida no es significativamente diferente del 100% y los intervalos de confianza incluyen el valor de 100%. Además el C.V. es menor a 3.0%, criterio de aceptación para métodos espectrofotométricos.
- 6) Respecto a la evaluación de la reproducibilidad del método, tanto para el acetaminofén como para la cafeína, el análisis de varianza de los resultados obtenidos al aplicar los métodos propuestos, confirmó que los métodos son reproducibles con

distintos analistas, con un mismo analista en diferentes días y con distintos analistas en diferentes días.

- 7) Respecto a la evaluación de la estabilidad de la muestra analítica, tanto para el acetaminofén como para la cafeína, las muestras son estables hasta 24 horas en temperatura ambiente, refrigeración y oscuridad, puesto que los resultados del factor I en cada caso, se encuentran dentro del intervalo de 97.0%-100.0%, que es el criterio de aceptación en métodos espectrofotométricos. Esto indica que es posible suspender el análisis de estas muestras antes de determinar las absorbancias respectivas, en un tiempo menor o igual a 24 horas, conservando las muestras en cualquiera de las condiciones antes mencionadas.

La conclusión final es que los métodos propuestos para cuantificar acetaminofén y cafeína en las tabletas estudiadas, están validados, son confiables como métodos de control de calidad y satisfacen los requerimientos para los que fueron desarrollados.

VII. - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Goodman & Gilman; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; 8ª edición; Editorial Médica Panamericana; México (1991); Págs. 606-620, 641-643
2. Cedric M., Smith M.D., Reynard Alam; Farmacologia; Editorial Panamericana (1993); Págs. 384-386
3. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; Secretaría de Salud; Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 6ª edición; México (1994); Págs. 422-423, 587-688, 1326-1328.
4. United States Pharmacopeial Convention, Inc.; USP 24; USA (1990); Págs. 17-24, 274, 1319.
5. Conn P. Michael, Ph.D., G.F. Gebhart; Principios de Farmacologia; Editorial El Manual Moderno; México (1991); Págs. 333-345
6. Litter Manuel; Compendio de Farmacologia; 4ª Edición; Editorial El Ateneo; México (1988); Págs. 1349-1353
7. Clarke E.G; Isolation and Identification of Drugs; 2a edición; London The Pharmaceutical Press (1986); Págs. 849-850, 420-422, 895-896.
8. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas; 45ª edición; Ediciones PLM; México (1999); Pág. 1650
9. MC Van Bárbara. Referencias Farmacéuticas; Editorial El Manual Moderno; México D.F. (1995); Págs. 146-148, 367-368

10. Comité de elaboración de guías oficiales de validación; Requisitos Mínimos para la Validación de un método analítico; Colegio Nacional de Q.F.B; México (1989).
11. Pharma News; Actualización en Tecnología Farmacéutica; "Procedimiento de Validación, Parámetros y Criterios de Aceptación"; Vol. 1/No 6; México (1990); Págs. 15-20.
12. The Merck Index; 11ª edition; Merck & Co. Inc. Rahway; USA 1989; Págs. 6
13. British Pharmacopeia; Vol. I; British Pharmacopeia commission secretarial; London (1988); Págs. 414, A29, 84, 85
14. Martindale; The Extra Pharmacopoeia; 31ª edition; Pharmaceutical Press; London (1996); Págs. 81.2, 1652.3, 925.2, 1586.2
15. Florey K. Analytical Profiles of Drugs Substance; Vol. 7; Edition Published by Academic Press Inc.; London (1978); Págs.36-41
16. Connors K.A. Curso de Análisis Farmacéutico; Editorial Reverté; España (1982); págs. 246-247, 574-575.
17. García M. Tesis: Desarrollo y Validación de un Método Analítico para determinar Metilbromuro de Mepenzolato en una suspensión oral que también contiene Furazolidona; México (1992).

18. Guerra Johnny; Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories; Pharmaceutical Technology; March (1986); Págs. 74-84
19. Dick John G; Química Analítica; Editorial El Manual Moderno; México (1979).
20. Murray R. Spiegel; Probabilidad y Estadística; Editorial Mc Graw Hill; 1ª edición; México (1991); Págs. 116-117, 258-276, 306-321
21. Morrison Robert & Boyd Robert; Química Orgánica; Editorial Iberoamericana; 2ª edición; México (1987); Págs. 952-975, 1261-1281