



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA DETERMINAR DIFENIDOL EN UNA SOLUCION INYECTABLE QUE TAMBIEN CONTIENE LIDOCAINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ISMAEL CHAVEZ JIMENEZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

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. María Luisa García Padilla.

VocalQ.F.B. María Teresa Buentello Rodríguez.

SecretarioQ.F.B. Ricardo Rodríguez Saenz

1er. SuplenteQ.F.B. Juan Manuel Rodríguez.

2do. Suplente.....Q.F.B. Irma José Nuñez.

El presente trabajo se desarrolló en el: ...

Departamento de Control Analítico, ubicado en el sótano del edificio "B de la Facultad de Química U.N.A.M.

ASESOR DE TEMA:



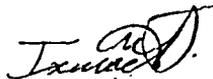
Q.F.B. María Luisa García Padilla.

SUPERVISOR TÉCNICO:



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

SUSTENTANTE:



Ismael Chávez Jiménez

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS	3
3	GENERALIDADES	4
3.1	ANTIEMÉTICOS	4
3.1.1	Reacción emética	4
3.1.2	Tipos de antieméticos.	5
3.1.3	Farmacocinética	5
3.1.4	Farmacodinamia	5
3.1.5	Indicaciones terapéuticas	5
3.1.6	Contraindicaciones	5
3.1.7	Reacciones secundarias	5
3.1.8	Dosis y vía de administración	5
3.2	MONOGRAFÍA DEL CLORHIDRATO DE DIFENIDOL	6
3.2.1	Nombres	6
3.2.2	Fórmula condensada	6
3.2.3	Fórmula desarrollada	6
3.2.4	Masa molecular:	6
3.2.5	Propiedades fisicoquímicas:	6
3.2.6	Ensayos de identidad	6
3.2.7	Métodos de valoración	6
3.3	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	9
3.3.1	Parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos.	10
3.3.2	Definiciones	11
3.4	MÉTODO DEL COLORANTE ÁCIDO	17
4	PARTE EXPERIMENTAL	19
4.1	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.	19
4.2	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	21
5	RESULTADOS	23
5.1	ESPECIFICIDAD	23
5.2	LINEALIDAD DEL SISTEMA.	27
5.3	REPETIBILIDAD DEL SISTEMA:	31
5.4	LINEALIDAD DEL MÉTODO	32
5.5	REPETIBILIDAD Y EXACTITUD AL 100%	35
5.6	REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.	35
5.7	ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES OBTENIDAS EN EL PROCESO DE ANÁLISIS.	36
6	CONCLUSIONES	38

1 INTRODUCCIÓN

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

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

Se entiende y se acepta que un buen producto es el resultado de un buen proceso y que ambos deben de ser probados y controlados para asegurar la calidad final. De la misma manera, dentro del aseguramiento de la calidad en el laboratorio, los métodos analíticos y procedimientos, constituyen el proceso que debe ser controlado para asegurar la calidad de los resultados, lo cual se logra a través de la validación.

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

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

Asimismo se tiene la experiencia de que los métodos compendiales descritos en las Farmacopeas, no producen los mismos resultados en productos que a pesar de tener el o los mismos principios activos, presentan diferente formulación, por lo que es necesaria la validación analítica para cada producto.

En el presente trabajo, se describe el desarrollo y la validación de un método indicativo de control de calidad para cuantificar Clorhidrato de Difenidol, un fármaco con propiedades antieméticas, formulado en la forma farmacéutica de solución inyectable, que también contiene Clorhidrato de Lidocaína. El medicamento se fabricó en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química de la UNAM.

Este estudio se realizó porque no existe un método oficial que permita su determinación en esta formulación, ya que el método espectrofotométrico descrito en la FEUM (7a Edición) para la cuantificación del Clorhidrato de Difenidol, materia prima, no es aplicable, pues existe interferencia, debida a la presencia del Clorhidrato de Lidocaína en el producto, ya que ambos principios activos presentan máximos de absorbancia en longitudes de onda cercanas.

Se aplicó el método del colorante ácido con base en la propiedad que tiene el Difenidol de reaccionar con un colorante ácido (Púrpura de Bromocresol) a determinado pH, para formar un compuesto de adición de color amarillo, que corresponde a un par iónico. Este compuesto es soluble en cloroformo, por lo que se extrajo con dicho disolvente y posteriormente se determinó la absorbancia de la solución obtenida, a 406 nm, en un espectrofotómetro adecuado. El mismo procedimiento se realizó con la sustancia de referencia correspondiente.

El método anterior se validó realizando el estudio estadístico, lo que implicó evaluar los siguientes parámetros analíticos:

Para el sistema: Linealidad y Precisión (evaluada como repetibilidad), mediante una solución patrón de la sustancia por analizar.

Para el método: Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión (evaluada como Reproducibilidad y Repetibilidad) y Estabilidad de la muestra analítica, mediante placebos adicionados.

2 OBJETIVOS

Desarrollar un método analítico indicador de control de calidad para cuantificar Clorhidrato de Difenidol en una solución inyectable que también contiene Clorhidrato de Lidocaína.

Validar el método analítico desarrollado, evaluando cada uno de los siguientes parámetros:

Para el sistema: Linealidad y Precisión (evaluada como Repetibilidad), mediante una solución patrón de la sustancia por analizar.

Para el método: Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión (evaluada como Reproducibilidad y Repetibilidad) y Estabilidad de la muestra analítica, mediante placebos adicionados.

La validación implicará verificar que los resultados obtenidos demuestren que el método de análisis es confiable y aplicable para el control de calidad del producto farmacéutico en estudio.

3 GENERALIDADES

3.1 Antieméticos: ^(1,14)

El complejo náusea-vómito es uno de los síntomas más frecuentes de enfermedad. Con frecuencia es inducido por ciertos fármacos y se presenta luego de una cirugía, de terapia radiactiva, durante el embarazo, en el cáncer gastrointestinal y como resultado de ciertos tipos de movimiento en personas hipersensibles.

Las náuseas persistentes pueden originar pérdida de apetito y disminución del ingreso alimenticio, produciendo desnutrición, quizá debilidad. Los vómitos prolongados intensos causan hipocloremia, hipopotasemia, alcalosis y deshidratación.

3.1.1 Reacción emética.¹

La emesis es un proceso complejo coordinado por el centro del vómito, el cual está situado en la formación reticular lateral del bulbo raquídeo. Este centro recibe estimulación proveniente de la zona quimiorreceptora desencadenante del área postrema, situada en el piso del cuarto ventrículo, el aparato vestibular a través del cerebelo, las estructuras del tallo encefálico y los ramos aferentes viscerales que se originan en estructuras periféricas como corazón, testículo y diversos sitios del tubo digestivo. La barrera hematoencefálica está muy poco desarrollada en el área postrema, de modo que la zona quimiorreceptora desencadenante es fácilmente accesible a las sustancias eméticas que se encuentran en circulación. Algunas señales periféricas saltan la zona desencadenante y llegan al centro emético por el núcleo del haz solitario (p.ej., desde faringe, estómago e intestino delgado). Más aún, los trastornos que retardan el vaciamiento gástrico promueven la emesis.

Después de la estimulación del centro del vómito, la emesis es mediada por diversas vías eferentes, entre ellas vago, nervios frénicos e inervación raquídea de los músculos abdominales. Las manifestaciones iniciales suelen consistir en náusea, durante la cual está reducido el tono gástrico, se encuentra disminuido o anulado el peristaltismo gástrico, y está incrementado el tono del duodeno y la parte superior del yeyuno, de modo que ocurre reflujo gástrico. Por último, se relaja la porción superior del estómago, mientras experimenta constricción el píloro y la contracción coordinada del diafragma y los músculos abdominales da por resultado expulsión del contenido gástrico por la boca.

3.1.2 Tipos de antieméticos.^{1,8}

El conocimiento de las vías neurales que culminan en la emesis ha establecido fundamentos para el empleo de antagonistas de serotonina, dopamina, acetilcolina e histamina como antieméticos.

La siguiente tabla muestra un criterio de selección para los fármacos antieméticos, dependiendo del problema que se presente.

Usos recomendados para Antieméticos / Agentes Antivértigo.			
Fármaco	Indicaciones		
	Nausea y Vómito	Mareo de Movimiento	Vértigo
ANTIDOPAMINÉRGICOS			
Clorpromazina	√		
Triflupromazina	√		
Perfenazina	√		
Proclorperazina	√		
Prometazina	√	√	
Tietilperazina	√		
Metoclopramida	√		
ANTICOLINÉRGICOS			
Ciclizina	√	√	
Meclizina	√	√	√
Buclicizina	√	√	
Difenhidramina		√	
Dimenhidrinato	√	√	√
Trimetobenzamida	√		
Escopolamina		√	
OTROS			
Difenidol	√		√
Benzquinamida	√		
Solución de Carbohidrato Fosforado	√		
Hidroxizina	√		
Corticoesteroides	√		
Canabinoides	√		

3.1.3 Farmacocinética⁷:

Después de la administración oral de Difenedol, el pico de concentración sanguínea del medicamento se presenta por lo general entre 1/2 y 3 horas. El Difenedol es excretado por la orina y heces dentro de los 3 a 4 días después de su administración.

3.1.4 Farmacodinamia⁷:

En náuseas y vómito, el Difenedol inhibe la zona quimiorreceptora que controla las náuseas y el vómito.

En vértigo, aparentemente ejerce una acción antivertiginosa específica sobre el aparato vestibular.

3.1.5 Indicaciones terapéuticas⁷:

Está indicado para prevenir y controlar náuseas y vómitos causados por enfermedades que afectan riñones, hígado, vesícula biliar y tracto gastrointestinal; alteraciones laberínticas, neoplasias malignas, radioterapia, agentes emetizantes (medicamentos, intoxicación alimenticia), estados posquirúrgicos, enfermedad del movimiento. Prevención y control del vértigo periférico como el de la enfermedad de Menière, laberintitis, otitis media, cirugía del oído medio e interno, trauma al aparato vestibular.

También puede ser útil para el control del vértigo central en casos como: insuficiencia de la arteria basilarvertebral, ciertos accidentes vasculares y sus secuelas y trauma que involucre el sistema nervioso central.

3.1.6 Contraindicaciones⁷:

Hipersensibilidad conocida al medicamento, anuria (aproximadamente el 90% se del medicamento se excreta en la orina; cuando disminuye el funcionamiento renal se puede acumular sistémicamente); embarazo y glaucoma.

3.1.7 Reacciones secundarias⁷:

Se ha informado de alucinaciones auditivas y visuales, desorientación y confusión mental.

3.1.8 Dosis y vía de administración⁷:

Vía de administración: Oral, intravenosa, intramuscular.

Dosis : Para adultos, en náuseas, vómito y vértigo:

Tabletas : La dosis inicial es de dos tabletas (50 mg) seguida de una o dos tabletas cada 4 horas .

Inyección intramuscular: Para un control rápido de los síntomas agudos, aplicar 1 a 2 mL (20- 40 mg) I.M profunda. Si los síntomas persisten, se puede inyectar otro mL una hora después. Posteriormente, aplicar 1 a 2 mL cada 4 horas si fuera necesario.

Inyección intravenosa: (Pacientes hospitalizados). Para un control rápido de los síntomas, se puede aplicar directamente o en la venoclisis 1 mL (20 mg). Si los síntomas persisten, se puede aplicar otro mL una hora después. Posteriormente se deberá cambiar la vía de administración a oral o intramuscular. La dosis total en 24 horas no deberá exceder de 300 mg. No se recomienda la administración subcutánea.

Nota: No se recomienda para niños menores de 6 meses de edad. No se recomienda la administración intravenosa o subcutánea a niños de cualquier edad.

Almacenamiento: Consérvese en lugar seco y fresco.

3.2 MONOGRAFÍA DEL CLORHIDRATO DE DIFENIDOL (22, 4, 19, 17, 7, 9.)

3.2.1 Nombres:

Químico:

Clorhidrato de 1, 1 – difenil-4- (1- piperidil)- 1- butanol

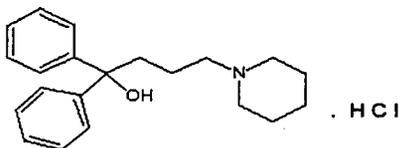
Genérico: Clorhidrato de Difenidol.

Registrados: Vontril, Vontrol.

3.2.2 Fórmula condensada:

$C_{21} H_{27} NO \cdot HCl$

3.2.3 Fórmula desarrollada:



3.2.4 Masa molecular:

345.93

3.2.5 Propiedades fisicoquímicas:

Descripción.- Polvo cristalino de color blanco.

Temperatura de fusión: 212° - 214°C.

Solubilidad: Fácilmente soluble en metanol; soluble en agua y cloroformo; prácticamente insoluble en éter, benceno y éter de petróleo.

3.2.6 Ensayos de identidad:

A. Espectroscopia infrarroja: El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión de la muestra en parafina líquida, exhibe máximos y mínimos solamente a las mismas longitudes de onda que los de una preparación similar de la Solución de referencia de Clorhidrato de Difenidol.

B. Una solución de la muestra (1:100) da reacción positiva a las pruebas de identidad para cloruros.

C. Espectroscopia ultravioleta: El espectro de absorción ultravioleta obtenido en la preparación de la muestra, según se indica en la valoración espectrofotométrica (inciso B de métodos de valoración), debe exhibir máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que la preparación de referencia.

3.2.7 Métodos de valoración:

A) Análisis volumétrico: Disolver 400 mg de la muestra en 100 mL de ácido acético glacial. Agregar 10 mL de SR de acetato mercúrico y titular con solución 0.1 N de ácido perclórico empleando SI de violeta de metilo. Hacer un blanco y efectuar las correcciones necesarias. Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 34.59 mg de Clorhidrato de Difenidol.

B) Análisis espectrofotométrico:

Preparación de referencia.-

Pesar una cantidad de Clorhidrato de Difenidol, de pureza conocida equivalente a 100 mg de Difenidol, pasar a un embudo de separación de 250 mL, agregar 50 mL de agua y 10 mL de solución 1N de hidróxido de sodio. Extraer con 3 porciones de cloroformo de 30 mL cada una. Combinar los extractos clorofórmicos en un embudo de separación de 250 mL y extraer con 3 porciones de solución 0.1N de ácido sulfúrico de 30 mL cada una. Colectar los extractos ácidos en un matraz volumétrico de 200 mL, llevar al aforo con solución 0.1N de ácido sulfúrico y mezclar.

Esta solución contiene 500 µg/mL de Difenidol.

Preparación de la muestra.-

Pasar una alícuota de la muestra, equivalente a 100 mg de Difenidol, a un embudo de separación de 250 mL, agregar 50 mL de agua y 10 mL de solución 1N de hidróxido de sodio y proseguir como se indica en la preparación de referencia a partir de "extraer con tres porciones de cloroformo".

Procedimiento:

Obtener el espectro de absorción, en un intervalo de longitud de onda comprendido entre 300 nm a 240 nm, de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra, a una velocidad baja, en celdas de 1 cm, empleando un ancho de rejilla de salida no mayor de 0.45 mm a 257 nm, y solución 0.1N de ácido sulfúrico como blanco de ajuste. Registrar el barrido 2 veces más, de 265 a 250 nm. Trazar una línea base uniendo los mínimos a 254.5 nm y 263 nm y trazar una línea perpendicular a la línea base de la gráfica, la cual pasa a través de la longitud de onda máxima de absorción e intercepta la línea base que conecta los mínimos. Restar la absorción de la línea base a esta longitud de onda (258 nm aproximadamente) de la absorbancia máxima de la curva y denominar el promedio de los tres valores como $-A$. Calcular las cantidades de Difenidol por mililitro en la muestra por medio de la siguiente fórmula:

$(DC/V)(-Am/-Aref)$; en donde, C es la concentración por mililitro de Difenidol en la preparación de referencia, D es el factor de dilución de la muestra, V es el volumen en mililitros de muestra tomada; $-Am$ es el promedio de los tres valores de absorbancia obtenidos con la preparación de la muestra y $-Aref$ es el promedio de los tres valores de absorbancia obtenidos con la preparación de referencia.

3.3 Validación de Métodos Analíticos ^(2,6,10,16,20,21)

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

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

La Ley General de Salud, ha servido como base regulatoria, pues en la Norma Oficial Mexicana número 059 menciona que el control aplicado a cualquier preparado farmacéutico deberá comprobarse y validar cualquier técnica empleada para este fin. Con esta regulación, las autoridades sanitarias del Sector Salud, exigen la validación de métodos analíticos.

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

La información que se requiere para la validación de un método analítico depende de la aplicación deseada y con base en esta, la USP 24 ha clasificado los procedimientos de ensayo en las siguientes categorías:

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

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

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

Las valoraciones ya establecidas aplicadas a nuevos productos deben ser validadas para verificar su exactitud y la ausencia de posibles interferencias.

Para cada una de estas categorías los requisitos de validación son diferentes. En la tabla 1 se presentan los parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos, basándose en las categorías mencionadas.

Tabla 2.

3.3.1 Parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos.

CATEGORÍA				
PARÁMETRO	1	2		3
		CUANTITATIVA	PRUEBA LIMITE	
Precisión	sí	sí	no	sí
Exactitud	sí	sí	*	*
Límite de Detección	no	no	sí	*
Límite de Cuantificación	no	sí	no	*
Especificidad	sí	sí	sí	*
Intervalo	sí	sí	*	*
Linealidad	sí	sí	no	*
Tolerancia	sí	sí	sí	sí

* Puede ser requerida, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

La validación incluye efectuar pruebas para:

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

Linealidad.

Precisión (como Repetibilidad).

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

Especificidad

Linealidad

Exactitud

Precisión (como Repetibilidad y Reproducibilidad)

Estabilidad de la muestra analítica.

Según Hokanson¹⁶, los parámetros de validación se dividen con base en las características que evalúan el comportamiento del método:

1. Parámetros que evalúan la adecuabilidad del sistema:

Especificidad

Linealidad.

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

Exactitud

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

Precisión

3.3.2 Definiciones

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

3.3.2.1 ESPECIFICIDAD.

Definición: (Para métodos indicadores de Control de Calidad).

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

Determinación:

Con el método propuesto analizar las siguientes soluciones siguiendo el procedimiento del método analítico (página 19)

a) Placebo del producto (contiene todos los componentes de la formulación excepto el principio activo que se analiza).

b) Solución de referencia.

c) Placebo que contenga todos los componentes de la formulación (incluyendo el principio activo que se analiza).

Criterio de aceptación:

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

La muestra (a) no presenta respuesta al método utilizado.

Las muestras (b) y (c) presentan respuesta similar al método utilizado.

3.3.2.2 LINEALIDAD*

Definición :

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

Determinación:

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

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

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

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

$$Y = m x + b$$

En donde:

Y= respuesta medida

m= pendiente de la recta

x = concentración

b= ordenada al origen .

Calcular :

La pendiente de recta (m).

La ordenada al origen (b).

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

Coefficiente de correlación (r).

El coeficiente de correlación es una cantidad sin dimensiones que se emplea para comparar las relaciones lineales entre pares de variables que tienen unidades distintas

Coefficiente de determinación (r^2).

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

Criterios de aceptación:

a) En sistema:

Coefficiente de Variación (C.V) debe ser $\leq 1.5\%$

Coefficiente de correlación (r) debe ser ≥ 0.99

Coefficiente de determinación (r^2) debe ser ≥ 0.98

b) En método:

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

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

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

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.

El coeficiente de correlación (r) debe ser ≥ 0.99

El coeficiente de determinación (r^2) debe ser ≥ 0.98

Si $F_r \geq F(g.l.r., g.l.er.; \alpha 0.01)$, entonces existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Si $F_{fa} > F(g.l.fa., g.l.ep.; \alpha 0.05)$, entonces existe falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada, propiedad medida.

3.3.2.3 PRECISIÓN

Definición :

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

La precisión es una medida del grado de repetibilidad y reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Por lo tanto, se evalúa en dichos términos.

La precisión se evalúa como:

Definición:

La precisión se expresa como la concordancia entre los valores de los resultados de mediciones experimentales sucesivas, que se obtienen bajo las mismas condiciones de trabajo (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.), que se conoce como repetibilidad y/o bajo diferentes condiciones de trabajo que se denomina como reproducibilidad.

a) Repetibilidad.

Determinación:

La repetibilidad del **sistema** se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución del analito correspondiente al 100%

Calcular:

El coeficiente de variación total (CV)

Criterio de aceptación:

El coeficiente de variación debe ser $\leq 1.5 \%$

La repetibilidad del **método** se determina al realizar el análisis de un mínimo de seis muestras correspondientes a un placebo adicionado con el 100% del analito

Calcular:

El coeficiente de variación total (CV)

Criterio de aceptación:

El coeficiente de variación debe ser $\leq 3.0 \%$

Reproducibilidad.

Definición:

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

Determinación:

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

Los análisis se realizan en dos días y por dos analistas, utilizando una muestra representativa del producto terminado.

Calcular:

El coeficiente de variación total (CV).

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

Criterios de aceptación:

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

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

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

3.3.2.4 EXACTITUD.

Definición:

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

Determinación:

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

Calcular:

La exactitud se evalúa por medio del modelo probabilístico " t de Student" y el cálculo del intervalo de confianza para la media, además del coeficiente de variación para el porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación:

El método es exacto si cumple con los siguientes criterios:

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

3.3.2.5 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA*

Definición:

Mediante este análisis se pretende conocer las condiciones en las cuales el proceso de análisis, mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado.

Esta proporciona una mayor confiabilidad en los resultados, pues se comprueba que no presenta degradación, antes de medir su respuesta para ser cuantificada.

Determinación:

El estudio de estabilidad de las soluciones analíticas se realiza en la forma siguiente: las soluciones recién analizadas, se almacenan en diferentes condiciones, por ejemplo, en refrigeración, a temperatura ambiente, en la oscuridad y en presencia de luz blanca. Posteriormente se vuelven a analizar en tiempos establecidos; (3, 6 y 24 horas), utilizando soluciones de referencia recién preparadas cada vez que se realiza el análisis.

Calcular :

Factor I.

Criterio de aceptación:

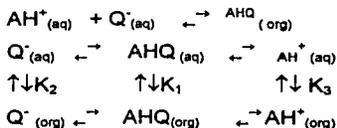
La media del factor (I) para cada condición/ tiempo se debe encontrar entre los valores de 97.0 y 103.0%.

***Nota:** Los cálculos requeridos para la evaluación de cada parámetro, se presentan en el anexo 1.

3.4 MÉTODO DEL COLORANTE ÁCIDO. ^(3,5,12,13,15,18)

El Método del Colorante Ácido es un método de análisis colorimétrico aplicable para la valoración de ciertas bases nitrogenadas. Este procedimiento, llamado también Extracción del Par Iónico, está basado en la reacción de un colorante aniónico con un compuesto catiónico (base protonada), en una solución amortiguadora de pH específico, para producir un compuesto de adición o par iónico colorido, el cual es soluble en un disolvente orgánico, con el que se extrae cuantitativamente, permitiendo su determinación espectrofotométrica. Los pares iónicos en algunos casos tienen una estequiometría sencilla 1:1 y la electroneutralidad se mantiene por los iones de ambos componentes. Cuando la reacción se efectúa con indicadores ácidos que son dipróticos como el Azul de Bromotimol o el Púrpura de Bromocresol, se obtienen pares iónicos de composición 1:2; es decir, una molécula de colorante reacciona con dos moléculas de la base nitrogenada.

En la extracción de una base como par iónico, existen una serie de equilibrios importantes que se efectúan al mezclarse conjuntamente el colorante aniónico y el compuesto catiónico, en el sistema de dos fases (orgánica-acuosa):



Donde: AH^+ es la base protonada.

Q^- es el colorante aniónico.

AHQ es el par iónico neutro.

K_2 y K_3 son los equilibrios que representan la partición del colorante aniónico y de la base protonada entre las fases acuosa y orgánica.

K_1 es el equilibrio que representa la partición del par iónico en las dos fases.

Si el analito es polibásico o se adiciona a la fase orgánica una sustancia que incremente el coeficiente de extracción del par iónico, entonces se deben considerar otros equilibrios adicionales por la presencia de varias especies iónicas y complejos.

En algunos casos, cuando el par iónico es inestable en presencia de luz o bien existe interferencia de otras sustancias, se requiere tratar la fase orgánica con una solución diluida de Hidróxido de Sodio para formar la sal sódica del colorante, la cual permanece en la fase acuosa. La intensidad de color que presenta la solución de Hidróxido de Sodio, está en función directa de la concentración de dicha sal y se mide en la región visible del espectro, para obtener de modo indirecto la concentración de la base que se liberó en la fase orgánica.

Los equilibrios en este método, dependen principalmente de los siguientes factores:

1.- pH de la solución amortiguadora. Para elegir el pH adecuado que permita la formación del par iónico, es necesario tener conocimiento de las constantes de disociación del colorante ácido (contra-ión) que se va a utilizar y del compuesto básico que se va a valorar, ya que, el pH que se seleccione depende de las características de partición de las dos sustancias y de sus productos de adición en los disolventes acuoso y orgánico. Normalmente, dependiendo del pK_a del colorante, la base estará presente en su forma iónica en concentración significativa, solamente en un intervalo limitado de pH. Así pues, es necesario que el intervalo de pH en el que está ionizado el contra-ión sea tal, que cubra el intervalo de ionización de la base. Por ejemplo, mientras los compuestos de amonio cuaternario están cargados positivamente en toda la escala de pH, la extracción de una amina como par iónico requiere de un pH suficientemente ácido que permita tener una concentración significativa del ión amonio conjugado y facilite la ionización del colorante, si éste es un ácido relativamente fuerte. Es por esta razón, que en este tipo de reacciones se utilizan los colorantes ácidos alquilfosfóricos, alquilsulfónicos y arilsulfónicos.

2.- Naturaleza y concentración óptima del colorante. El colorante se emplea en exceso, lo cual no causa interferencia, ya que al controlar el pH de la fase acuosa se reduce la cantidad del colorante en la fase orgánica. Sin embargo, se recomienda correr un blanco de reactivos, para eliminar el error causado por la pequeña cantidad de colorante que podría estar presente en la fase orgánica. Se sugiere trabajar con un pH arriba del pK_a del colorante, si su coeficiente de partición intrínseco es relativamente grande. La condición anterior se elimina si la forma ácida del indicador es insoluble en la fase orgánica.

El tamaño y polaridad de los sustituyentes del contra-ión también influyen en la eficiencia de la extracción. En general, los grupos no polares grandes (arilo o alquilo), incrementan el coeficiente de partición del par iónico en el disolvente orgánico, mientras que los grupos pequeños o polares (hidroxilo, carboxilo o amino) lo reducen.

3.- Naturaleza del disolvente. El coeficiente de partición del par iónico depende en gran medida de la capacidad del disolvente para formar uniones hidrógeno. Se ha encontrado que se obtiene un coeficiente de partición elevado cuando se forman uniones fuertes de hidrógeno entre el catión y el anión del par y entre el par iónico y el disolvente. Por esta razón, se propone que los compuestos donadores o aceptores de hidrógenos requieren ser extraídos con disolventes donadores o aceptores de protones respectivamente. Sin embargo, la selectividad es mayor, si el contra-ión es el componente del par iónico, que dona los protones para unirse al disolvente.

Los enlaces de hidrógeno de los componentes del par iónico, influyen tanto en su polaridad como en la unión al disolvente. Puesto que los componentes de un par iónico están unidos por fuerzas electrostáticas, las uniones hidrógeno entre los iones, bajan la polaridad del par iónico e incrementan la constante de extracción. El complejo es soluble en disolventes de baja polaridad, porque las cargas iónicas de compuestos orgánicos que poseen cationes o aniones grandes, son protegidas por el disolvente.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Desarrollo del Método Analítico.

Este estudio se realizó porque no existe un método oficial que permita su determinación en esta formulación, ya que el método espectrofotométrico descrito en la FEUM (7a Edición) para la cuantificación del Clorhidrato de Difenidol, materia prima, no es aplicable, pues existe interferencia, debida a la presencia del Clorhidrato de Lidocaína en el producto, ya que ambos principios activos presentan máximos de absorbancia en longitudes de onda cercanas.

En base a una investigación bibliográfica se encontró reportado el método del colorante ácido, el cual es un método de análisis colorimétrico aplicable para la valoración de ciertas bases nitrogenadas.

Se aplicó el método del colorante ácido con base en la propiedad que tiene el Difenidol de reaccionar con un colorante ácido (Púrpura de Bromocresol) a pH de 5.3, para formar un compuesto de adición de color amarillo, que corresponde a un par iónico. Este compuesto es soluble en cloroformo, por lo que se extrajo con dicho disolvente y posteriormente se determinó la absorbancia de la solución obtenida, a 406 nm, en un espectrofotómetro adecuado. El mismo procedimiento se realizó con la sustancia de referencia correspondiente.

Enseguida se describe el procedimiento de la metodología propuesta para ser validada:

El método analítico para la cuantificación de Difenidol, se desarrolló en una solución inyectable que presenta la siguiente formulación:

Clorhidrato de Difenidol

equivalente a.....40 mg de Difenidol.

Clorhidrato de Lidocaína.....10 mg.

Propilenglicol.....20 mg.

Vehículo cbp.....2 mL.

Reactivos:

Fosfato de Sodio Monobásico Hidratado R.A.

Fosfato Disódico Anhidro R.A.

Púrpura de Bromocresol R.A.

Hidróxido de Sodio R.A.

Cloroformo R.A.

Sulfato de Sodio R.A.

Soluciones Reactivo:

Solución amortiguadora de fosfatos, pH 5.3

Disolver 3.8 g de Fosfato de Sodio Monobásico Hidratado R.A. y 0.2 g de Fosfato Disódico Anhidro R.A. en agua destilada, diluir a 100 mL y mezclar. Verificar el pH de la solución resultante y en caso necesario ajustar a 5.3.

Solución del colorante de púrpura de Bromocresol:

Disolver 0.08 g de púrpura de Bromocresol R.A. en una mezcla de 50 mL de agua destilada y 1.3 mL de solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N aproximadamente y si es necesario ajustar el pH de la solución a 5.3 con solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N aproximadamente, diluir a 100 mL y mezclar.

Solución A:

Mezclar volúmenes iguales de la solución amortiguadora de fosfatos pH 5.3 y de la solución del colorante de Púrpura de Bromocresol.

Solución de Hidróxido de Sodio 0.05 N aproximadamente.

Preparación de la solución de referencia.

Pesar una cantidad de Clorhidrato de Difenidol, sustancia de referencia, equivalente a 20 mg de Difenidol, transferir a un matraz volumétrico de 200 mL, adicionar agua destilada, agitar hasta disolución completa, agregar agua destilada hasta el aforo y mezclar.

4.1.4.-Preparación de la solución de la muestra problema.

Preparar una muestra representativa y transferir a un matraz volumétrico de 200 mL un volumen de solución inyectable equivalente a 20 mg de Difenidol, llevar hasta volumen con agua destilada y mezclar.

Procedimiento.

Transferir 5 mL de la solución de referencia, 5 mL de la solución de la muestra y 5 mL de agua destilada (blanco de reactivos) a cada uno de tres embudos de separación de 125 mL y proceder en todos los casos como se indica a continuación:

Agregar 5 mL de la solución A y agitar por 30 segundos. Extraer con tres porciones de cloroformo de 20, 20 y 9 mL respectivamente, agitando durante 30 segundos en cada extracción. Filtrar las fases clorofórmicas a través de papel filtro Whatman No 1 que contenga 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, previamente humedecido con Cloroformo. Recibir la solución clorofórmica filtrada en un matraz volumétrico de 50 mL, llevar al volumen con cloroformo y mezclar.

Determinar las absorbancias de las soluciones obtenidas (soluciones de sustancia de referencia, de la muestra problema y del blanco de reactivos), en un espectrofotómetro adecuado, a 406 nm, utilizando Cloroformo R. A., como blanco de referencia.

Cálculos.

Calcular la cantidad de Difenidol expresada en gramos, contenida en 1 mL de solución, aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{mg de Difenido /mL de solución inyectable} = \left(\frac{A_p - A_{bl}}{A_{ref} - A_{bl}} \right) \times C_x F_x 0.8947 / V$$

En donde:

A_p = Absorbancia de la solución de la muestra problema.

A_{ref} = Absorbancia de la solución de la sustancia de referencia.

A_{bl} = Absorbancia de la solución del blanco.

C = Concentración de Clorhidrato de Difenidol (sustancia de referencia), en la solución final, expresada en mg/mL.

F = factor de dilución de la muestra.

V = Volumen de la muestra en mL, utilizada en el análisis.

0.8947 = Masa molecular del Difenidol / Masa molecular del Clorhidrato de Difenidol.

4.2 Validación del Método Analítico.

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

a.-Especificidad

Se efectuó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitudes de onda entre 350 y 450 nm de las siguientes muestras:

1. Solución de la Sustancia de Referencia
2. Solución de la Muestra Problema.
3. Solución del Placebo.

b.-Linealidad del Sistema

Se prepararon soluciones en concentraciones del 80, 90, 100, 110 y 120 % de Difenidol. Cada una de las concentraciones se analizó por duplicado.

c.-Repetibilidad del Sistema.

Este parámetro se evaluó analizando por sextuplicado una solución de Clorhidrato de Difenidol, sustancia de referencia, en concentración correspondiente al 100% de Difenidol.

d. Linealidad del Método

Se analizaron muestras de placebos adicionados con Clorhidrato de Difenidol, en concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120 % de la cantidad de Difenidol expresada en el marbete, de la solución inyectable.

Cada placebo cargado se analizó por triplicado.

e. Exactitud del Método

Se efectuó analizando seis muestras diferentes de placebos, adicionados con Clorhidrato de Difenidol, en una concentración del 100 % de la cantidad de Difenidol expresada en el marbete de la solución inyectable.

f.-Repetibilidad del Método

Se analizaron seis muestras diferentes de un placebo al que se adicionó Clorhidrato de Difenidol, en una concentración del 100 % de la cantidad de Difenidol expresada en el marbete de la solución inyectable.

g. Reproducibilidad del Método

Dos analistas realizaron por triplicado, en 2 días diferentes, la valoración, en muestras de un placebo al que se le adicionó Clorhidrato de Difenidol, en una concentración del 100 % de la cantidad de Difenidol expresada en el marbete de la solución inyectable.

h. Estabilidad de la muestra analítica.

Para evaluar este parámetro, se analizó un placebo al que se le adicionó Clorhidrato de Difenidol, en una concentración que corresponde al 100 % de la cantidad de Difenidol expresada en el marbete.

Se llevó a cabo el procedimiento para obtener la "solución de la muestra problema"; la solución preparada, se mantuvo durante 3, 6 y 24 horas en las condiciones que a continuación se indican:

- (1)Luz blanca
- (2)Oscuridad
- (3)Refrigeración

Se determinaron las absorbancias, siguiendo los lineamientos del "procedimiento" con el objeto de cuantificar el Difenidol, en la solución recién preparada y después de 3, 6 y 24 horas de mantener la muestra en las condiciones señaladas, utilizando en cada caso, una solución de referencia recién preparada.

5 RESULTADOS

Nota: Las cantidades adicionadas y encontradas, se determinaron mediante cálculos y se expresan a nivel $\mu\text{g}/\text{mL}$ para fines prácticos.

5.1 Especificidad.

Los resultados obtenidos de la especificidad se expresan en la Tabla No. 3 y en los espectrogramas que corresponden a cada una de las muestras analizadas (espectrogramas No. 2, 3 y 4).

Tabla No. 3 Especificidad del método analítico.

Solución de	Absorbancia ₁ ($\lambda = 404.7 \text{ nm}$)	Absorbancia Corregida ($\lambda = 404.7 \text{ nm}$)	C α ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de Difenidol	Ce ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de Difenidol
Clorhidrato de Difenidol (Sustancia de Referencia)	0.652	0.634	10.3	10.3
Muestra Problema	0.650	0.632	10.2	10.2
Placebo (vehículo + Clorhidrato de Lidocaína)	Despreciable	-	-	-
Blanco de Reactivos	0.018	-	-	-

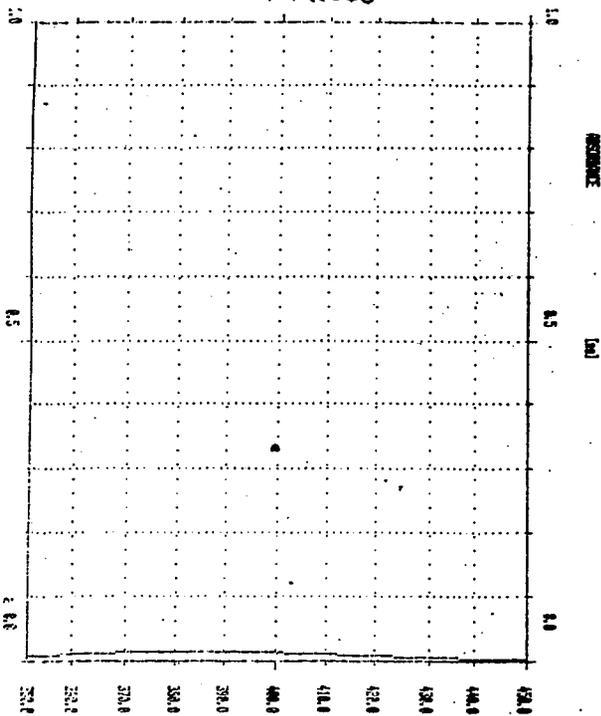
Absorbancia corregida = Absorbancia₁ – Absorbancia del blanco de reactivos.

C α = Cantidad agregada de Difenidol.

Ce = Cantidad encontrada de Difenidol.

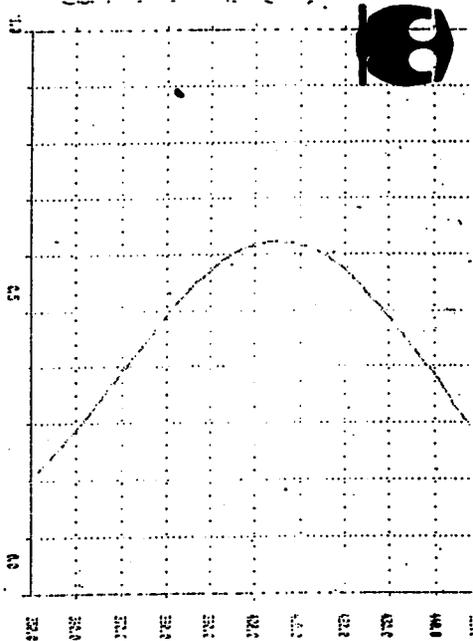
Enseguida se muestran los espectrogramas obtenidos de las soluciones preparadas para demostrar la especificidad del método analítico.

Placebo



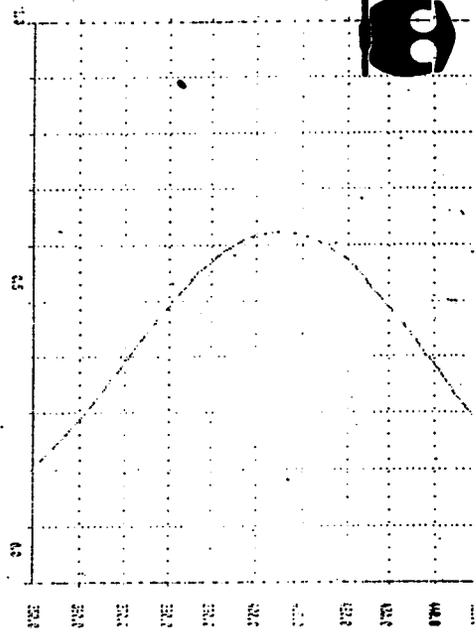
Espectrograma No.1.Solución del placebo (sin Difenidol)

CONCENTRACION
MUY ALTA



Espectrograma No. 2. Solución de la Sustancia de Referencia

CONCENTRACION : 0.100
MUESTRA : 1.100



Espectrograma No. 3. Solución de la muestra problema (solución inyectable)

Analizando los datos de la Tabla No. 2 y los espectrogramas obtenidos, se plantean las observaciones siguientes:

1.- La espectrofotometría visible de las soluciones obtenidas al efectuar el procedimiento del método propuesto, para la valoración de Difenidol, en la solución de la sustancia de referencia y en la solución inyectable en estudio (solución de la muestra problema), presentan espectrogramas semejantes, con máximos de absorbancia a 404.7 nm y con valores de absorbancia cercanos.

2.-El blanco de reactivos y el placebo presentan absorbancias muy bajas, por lo que ni el Clorhidrato de Lidocaina ni el vehículo de la solución inyectable causan interferencia en la determinación de Difenidol para el método propuesto.

Por lo antes expuesto, se concluye que el método es específico.

5.2 Linealidad del Sistema.

En la tabla No. 4 se presentan los resultados obtenidos para la Linealidad del Sistema y en la gráfica No. 1 se observa la tendencia lineal entre los datos:

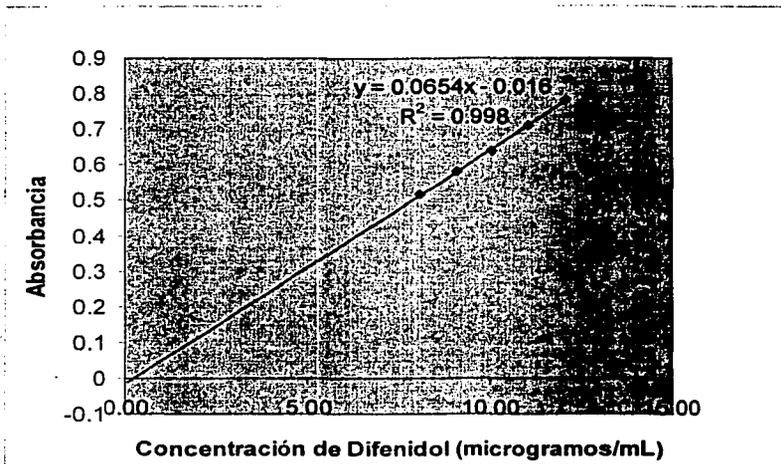
Tabla No. 3 Linealidad del sistema

Concentración de Difenidol %	Concentración de Difenidol ($\mu\text{g/ml}$ de Difenidol)	Absorbancia
80	8.16	0.514
	8.12	0.512
	7.95	0.516
90	9.18	0.586
	9.13	0.572
	8.94	0.578
100	10.20	0.638
	9.84	0.619
	10.15	0.651
110	11.22	0.724
	11.17	0.698
	10.92	0.706
120	12.24	0.781
	12.19	0.777
	11.92	0.780

Tabla No 4 Linealidad del sistema

Concentración de Difenidol %	Promedio de la Concentración de Difenidol (µg/ml)	Absorbancia Promedio	Regresión Lineal
80	8.08	0.514	r=0.9990 r ² =0.9980
90	9.08	0.577	
100	10.06	0.636	
110	11.10	0.709	
120	12.12	0.770	

LINEALIDAD DEL SISTEMA
Clorhidrato de Difenidol (Sustancia de Referencia)



Gráfica No. 1. Linealidad del Sistema.

Tabla de resultados de Linealidad del Sistema

	Resultado	Criterio de Aceptación
Coefficiente de determinación (r^2)	0.998	≥ 0.98
Coefficiente de variación (%)	0.60%	Menor a 1.5%
Coefficiente de correlación (r)	0.999	≥ 0.99
Pendiente (m)	0.0653	Intervalo de Confianza (0.0615 a 0.0692)
Intercepto (b)	-0.0160	Intervalo de Confianza (-0.0552 a 0.0231)

El sistema de medición es lineal, ya que r cumple con el criterio de aceptación como se muestra a continuación:

Coefficiente de correlación (r): 0.9991

Como $r > 0.99$, hay una relación entre la concentración de Difenidol y la respuesta obtenida (absorbancia). La relación se representa por la línea recta propuesta.

5.3 Repetibilidad del Sistema:

La tabla No. 5 presenta los resultados obtenidos para evaluar este parámetro.

Tabla No. 5

Determinación	Concentración($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
1	10.06	0.653
2	10.06	0.650
3	10.06	0.651
4	10.06	0.652
5	10.06	0.657
6	10.06	0.644

$$n=6$$

$$\bar{x}= 0.651$$

$$S_x= 0.0043$$

$$C.V = 0.6\%$$

El sistema de medición es repetible, ya que el C.V. obtenido en forma experimental es menor del 1.5%.

5.4 Linealidad del Método

La Tabla No.6 presenta las diferentes concentraciones por triplicado de Clorhidrato de Difenidol en los placebos cargados, la cantidad adicionada, la cantidad encontrada y el porcentaje correspondiente. En la gráfica No. 2 se observa la tendencia lineal de éstos.

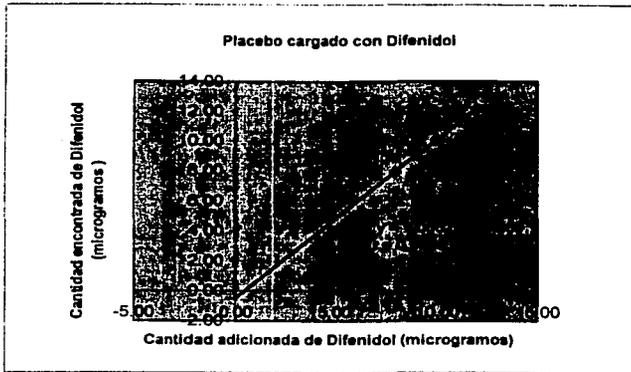
Tabla No. 6

Concentración de Difenidol %	Cantidad adicionada de Difenidol (μg)	Cantidad encontrada de Difenidol (μg)	% encontrado
80	7.98	7.88	98.7
	7.98	7.89	98.9
	7.98	7.95	99.6
100	9.98	10.10	101.2
	9.98	9.97	99.9
	9.98	10.10	101.2
120	11.97	12.27	102.5
	11.97	12.05	100.7
	11.97	12.03	100.5

Tabla No. 7 Linealidad del Método

Concentración de difenidol %	Promedio cantidad adicionada de Difenidol (μg)	Promedio de cantidad Encontrada de Difenidol (μg)	Regresión Lineal
80	7.98	7.91	$m=1.0552$ $b= -0.4969$ $r= 0.999$ $r^2=0.999$
100	9.98	10.06	
120	11.97	12.12	

LINEALIDAD DEL METODO



Gráfica No. 2 Linealidad del método

Tabla de resultados de Linealidad del método

	Resultado	Criterio de Aceptación
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999	≥ 0.98
Coefficiente de correlación (r)	0.999	≥ 0.99
Pendiente (m)	1.0551	Intervalo de Confianza (0.9090 a 1.2012)
Intercepto (b)	-0.4969	Intervalo de Confianza (-1.9735 a 0.9796)

Los siguientes resultados corresponden al cálculo de los límites de confianza aplicada tanto a la pendiente como a la ordenada al origen.

Pendiente	Ordenada al origen
$t_{cal} = 4.3582$	$t_{cal} = 4.2760$
$t_{lab} = (1, 0.975) = 12.7060$	$t_{lab}(1, 0.975) = 12.7060$
L.S. = 1.2012	L.S. = 0.9796
L.I. = 0.9090	L.I. = -1.9735

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

- Pendiente (m):

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

- Ordenada al origen (b):

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

- Coeficiente de correlación (r):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que éste debe de ser $r \geq 0.99$ y el resultado obtenido fue de 0.9999

- Coeficiente de determinación (r^2):

El criterio de aceptación indica que éste deberá ser $r^2 \geq 0.98$ y el resultado obtenido fue 0.9999, por lo anterior, ya no es necesario realizar la "prueba de F" pues ésta solo se realiza cuando el coeficiente de determinación obtenido es muy cercano al valor límite de 0.98.

5.5 Repetibilidad y Exactitud al 100%

En la tabla No. 8 se presentan los datos obtenidos, necesarios para evaluar este parámetro.

Tabla No.8

Cantidad Adicionada de Difenidol ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad Encontrada de Difenidol ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperado
9.976	10.108	101.3
9.976	9.977	100.0
9.976	10.108	101.3
9.976	10.120	101.4
9.976	10.008	100.3
9.976	9.930	99.5

$$n=6$$

$$\bar{x}= 100.6 \%$$

$$S= 0.8256$$

$$C.V = 0.8 \%$$

$$t_{cal}= 1.9173$$

$$t_{lab}=(5,0.95) = 2.5706$$

Como el Coeficiente de Variación obtenido (0.8%) es menor que el valor límite para métodos espectrofotométricos: 3.0%, entonces el método de medición es repetible.

Intervalo de confianza para el % recuperado.

- I.C. = 100.63 ± 3.16
- L.S.= 103.80
- L.I. = 97.46

Como $|t_{cal}| < t_{lab}(5, 0.95)$ y los límites de confianza incluyen al 100%; entonces se acepta H_0 y se concluye que el valor de la media obtenida en forma experimental, no es significativamente diferente del 100%; por lo tanto, el método propuesto es exacto.

5.6 Reproducibilidad del Método.

En la tabla No. 9 se indican los resultados obtenidos al efectuar el procedimiento del método propuesto para la valoración de Difenidol, en la muestra problema, por dos analistas y en dos días diferentes.

Tabla No 9

Día	% Recobro	
	Analista 1	Analista 2
1	101.3	101.9
	100.0	99.3
	101.3	100.8
2	101.3	102.7
	100.0	100.8
	99.5	101.2

n=12

$\bar{x}=100.8\%$

Sx=0.99

C.V.=1.0%

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

2) Tabla de análisis de Varianza.

Tabla No. 10

FV	GL	SC	MC	Fcal	Ftab
A(i)	1	0.9075	0.9075	1.0342	38.5100
D(j)	1	0.8775	0.8775	0.8441	6.0600

Como:

a) Efecto por analista : $1.0342 < 38.5100$

b) Efecto entre día : $0.8441 < 6.0600$

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

5.7 Estabilidad de las soluciones obtenidas en el proceso de análisis.

La Tabla No. 11 presenta los resultados de la valoración de Clorhidrato de Difenidol, después de mantener las soluciones analíticas en las condiciones indicadas.

Tabla No 11

Tiempo (h)	Condición		
	Luz blanca	Oscuridad	Refrigeración
0	100.8%	100.8%	100.7%
3	100.8%	100.7%	100.4%
6	100.6%	100.6%	100.1%
24	99.7%	100.0%	99.5%

En la tabla No. 12 se presenta el valor del factor I para las diferentes condiciones:

Tabla No. 12

Tiempo (h)	Condición		
	Luz blanca	Oscuridad	Refrigeración
3	100.0%	99.9%	99.7%
6	99.8%	99.8%	99.4%
24	98.9%	99.2%	98.8%

Como se observa en la tabla No. 12, bajo las tres condiciones de almacenamiento la muestra se mantiene estable al menos durante 24 horas ya que todos los valores obtenidos del factor I se encuentran entre 97.0% – 103.0%.

6 CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos al efectuar el procedimiento del método propuesto, para valorar Clorhidrato de Difenidol en la solución inyectable estudiada, se plantean las conclusiones siguientes:

6.1. - El método propuesto para la valoración de Difenidol en la solución inyectable estudiada, es específico, ya que se encontró que en las condiciones de análisis, el blanco de reactivos y el placebo no presentaron absorbancia a 406 nm, que es la longitud de onda en que se presenta el máximo de absorción, para la sal sódica colorida del Púrpura de Bromocresol. Con base en el fundamento del método del colorante ácido se deduce que el Difenidol por tener un grupo amino terciario en su estructura pudo reaccionar con el purpura de bromocresol a pH de 5.3 y formar el par iónico colorido, el cual fue soluble en cloroformo y se logró extraer cuantitativamente para su posterior determinación espectrofotométrica. Asimismo, los espectrogramas de las soluciones obtenidas después de efectuar el procedimiento analítico en la solución de Referencia de Difenidol y en la solución de la muestra problema son semejantes.

6.2.- El sistema y el método de medición son lineales, basándose en lo siguiente:

a) El análisis de la Gráfica No. 1 (pág. 29) permite observar la tendencia lineal del sistema, cuando se valoró Difenidol, Sustancia de Referencia, en un intervalo de concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120%.

b) La Gráfica No. 2 (pág. 33) refleja la linealidad del método propuesto, cuando se valoró Difenidol en la solución inyectable, en un intervalo de concentraciones de 80%, 100% y 120%.

c) Tanto en el sistema como en el método, el coeficiente de correlación obtenido es mayor de 0.99, por lo que se concluye que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida. En el método, las pruebas de t aplicadas, demuestran que los valores obtenidos de la ordenada al origen y de la pendiente no son significativamente diferentes de 0 y 1, respectivamente.

6.3.- El método propuesto es exacto, ya que el resultado de la prueba t aplicada, demuestra que el valor de la media experimental no es significativamente diferente del 100% de la cantidad de Difenidol respecto al valor de referencia. Además, el coeficiente de variación obtenido, fue menor de 3.0% (pág.35).

6.4.-El método propuesto es repetible, ya que, en las pruebas efectuadas en la Sustancia de referencia, el C.V. obtenido fue menor a 1.5% para el sistema (pág. 35) y en las determinaciones realizadas en la solución inyectable, el C.V. fue menor de 3.0% (pág. 39).

6.5.- El método propuesto es reproducible, pues al realizar las pruebas de valoración de Difenidol en la solución inyectable, bajo diferentes factores de variación, se obtuvieron valores que cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación especificados para el C.V. y para el análisis de varianza efectuado (pág.36).

6.6.- La solución clorofórmica que contiene el par iónico formado, (solución colorida), es estable bajo las tres condiciones de almacenamiento propuestas, al menos durante 24 horas, por lo tanto, se comprobó que si se interrumpe el análisis hasta antes de la medición de la absorbancia, la muestra se puede almacenar en cualquiera de las condiciones propuestas, por tiempo menor o igual a 24 horas.

Conclusión final:

Los resultados obtenidos muestran que los parámetros evaluados en el método propuesto, cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación establecidos. Así pues, se demostró la confiabilidad del método desarrollado para la cuantificación de Difenidol en la solución inyectable estudiada.

ANEXO 1

LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.

(En Linealidad del Sistema solamente se calcula r y r²)

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

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

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

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

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

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

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

H₀: m = α

H₁: m ≠ α α = 1

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

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

H₀: b = β

H₁: b ≠ β β = 0

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

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

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

c) Intervalos de confianza:

* Desviación Estándar para la ordenada al origen (S b):

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

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

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

* Desviación Estándar para la pendiente (S m):

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

c.2) Límites de confianza para la pendiente:

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

donde: m = valor experimental de la pendiente

α = valor teórico de la pendiente = 1

b = valor experimental de la ordenada al origen

β = valor teórico de la ordenada al origen = 0

x_i = cantidad adicionada del fármaco

y_i = cantidad encontrada del fármaco

\bar{x} = media de las cantidades adicionadas

S_x = desviación estándar de las cantidades adicionadas

N= número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución

t = número de diluciones

n = número de determinaciones

\hat{y} = Los valores de y_i son los puntos sobre la línea de regresión y corresponden a los \hat{x}_i valores individuales de x_i .

Los valores de \hat{y}_i para un valor dado de x_i , son fácilmente calculados de la ecuación de regresión.

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

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

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

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

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

(5) Construcción de la Tabla de Análisis de Varianza:

a) Scr = Suma de cuadrados de regresión.

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

b) $SCer$ = Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SCer = \sum y^2 - (m)(\sum xy) - (b)(\sum y)$$

c) $SCep$ = Suma de cuadrados del error puro.

$$SCep = \sum y^2 - (\sum y^2) / r$$

d) $SCfa$ = Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$$SCfa = SCer - SCep$$

Tabla No 1

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Fexp
Regresión	1	SCR	SCR	MCr $Fr = \frac{SCR}{MCer}$
Falta de Ajuste	(n-2)-t (r-1)	Scfa	SCep g.l.f.a.	$MCfa$ $Ffa = \frac{Scfa}{MCep}$
Error Puro	t (r-1)	Scep	Scep g.l.e.p.	
Error de Regresión	n-2	Scer	Scer g.l.e.r.	

t = Número de concentraciones

r = Número de replicaciones por concentración

n = r t = Número de pares ordenados

REPETIBILIDAD

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la repetibilidad.

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

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

- 2) Determinar la Desviación Estándar de los resultados.

$$S = \sqrt{\frac{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}{N(N-1) \cdot 2}}$$

- 3) Determinar el coeficiente de variación.

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

EXACTITUD AL 100%

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la exactitud del método

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

- 2) Calcular la media aritmética del porcentaje de recobro.

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

- 3) Calcular la desviación estándar del porcentaje de recobro.

$$S = \sqrt{\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1) \cdot 2}}$$

Calcular el coeficiente de variación.

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

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

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

$H_1 : R \neq \mu$

$R - \mu$

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

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

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

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

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

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

Tabla No 2

		Analista (i)	
		%Encontrado	
		1	2
D A (j)	1	Y_{111}	Y_{111}
		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 de cada analista (primer subíndice), en cada día (segundo subíndice), para cada repetición (tercer subíndice).

Calcular las siguientes sumatorias:

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

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

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

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

$$5) S y_{ijk}^2 = [(Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{223})^2]$$

Proceder conforme la siguiente tabla de análisis de varianza.

Tabla No 3

Fuente de Variación (FV)	Grados de libertad (GL)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de Cuadrados (MC)	F calculada	F tab (0.05, GLn um/Glden)
Analista (A)	A (I - 1)	$\frac{\sum Y_i^2 - (\sum y_{ijk})^2}{jk}$	$\frac{SCA}{(I - 1)}$	$\frac{MCA}{MCAD}$	$\frac{(i-1)}{(j-1)}$ 0.05, _____
Día (D) Dj	(j - 1)	$\frac{\sum Y_j^2 - \sum Y_{ii}^2}{k}$	$\frac{SCD}{(j - 1)}$	$\frac{MCD}{MCAD}$	$\frac{(j-1)}{(i-1)(j-1)}$ 0.05, _____
Error Experimento (E) Eijk	ij (k - 1)	$\frac{\sum Y_{ijk}^2 - \sum Y_{ij}^2}{k}$	$\frac{SCE}{ij (k - 1)}$		

Donde: i= número de analistas; J= número de días; k= número de repeticiones.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

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

Tabla No 4

6.1.1.1.2 Tiempo	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
24	Y ₄	Y ₁₃	Y ₂₂
	Y ₅	Y ₁₄	Y ₂₃
	Y ₆	Y ₁₅	Y ₂₄

Cálculo del coeficiente de variación:

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

(análisis muestra/condición / tiempo)

$$I = \frac{\text{-----}}{\text{(análisis inicial)}} \times 100$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$I_{27} = \frac{Y_{27}}{Y_1} \times 100$$

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

ΣI (condición/tiempo)

$$I = \frac{\text{-----}}{N}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bowman, W.C. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas. Edit. Interamericana. 2ª Edición. (1984). pp: 25.5-25.8.
2. Casaringne, R. H., Munguía B. y cols. Material del curso Control y Aseguramiento de la Calidad Analítica en el Laboratorio. (1994).
3. Chatten, L.G. and Okamura, K. O. "Assay of quaternary Ammonium compounds in various Dosage Forms by Acid-Dye Method". J. Pharm. Sci., 62.(1973). pp: 1328.
4. Clarke E.G.C. y cols. Isolation and identification of Drugs. 2ª edition. Edit. The Pharmaceutical Press. London. (1996). pp: 558.
5. Connors, K. A. A Textbook of Pharmaceutical Analysis. Second Edition. A Wiley Interscience Publication. New York. (1975). pp: 514.
6. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Requisitos mínimos para la Validación de un Método Analítico. Colegio Nacional de Q.F.B. Secretaría de Salud. México. (1991).
7. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 40 Edición. Ediciones PLM. México (1994). pp:2084
8. Drug Information. Hospital Formulary Service. American Society of Pharmacist. U.S.A. (1992). pp: 215.
9. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª Edición. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos. México. (1994). pp: 506.
10. Frías, J. Alejandro. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para determinar cafeína en un jarabe que también contiene Acetaminofén, Maleato de Clorfeniramina y Clorhidrato de Fenilpropranolamina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. (1995).
11. Garret, E. R. and Hirtz, J.L. Drug Fate and Metabolism. Methods and Techniques. Vol.1. Marcel Dekker, Inc. New York. (1977). pp: 135-185.
12. Hauerbach, M.E. "Germicidal Quaternary Ammonium salts in Dilute Solution". Ind Eng. Chem., Anal.Ed.15. (1943). pp: 492.
13. Helgren, P.e., Theivagt, J.G. and Campbell, D.J. " Methods for the Determination of Tral , A New Anticholinergic Drug". J Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.46. (1957). pp: 639.
14. Goodman and Gilman A . y cols. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol.1. 9ª edición. Edit. Médica Panamericana. México (1996). pp:993-999.
15. Higuchi, T. and Bodin, J.I. Phamaceutical Analysis. Edit. John Wiley and Sons. U.S.A. (1961). pp:413-418.
16. Hokanson, C. A life approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development. Part I. The initial method validation process. Pharmaceutical Technology. 18 (9). (1994). pp: 118-130.
17. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 30 edition. Edit. The Pharmaceutical Press. London (1996). pp: 1215-1216.
18. Mukerje, P. "Use of Ionic Dyes in the Analysis of Surfactans and Other Ionic Organic Compounds". Anal. Chem., 28. (1956). pp: 870.
19. Remington's Pharmaceutical Sciences. 18 th edition Mack Publishing Company. U.S.A.(1990). pp: 792.

20. Seminario de Validación en la Industria Farmacéutica. Asociación Farmacéutica Mexicana. Mayo, (1994). Facultad de Química. U.N.A.M.
21. The United States Pharmacopeia . The National Formulary . USP 24 NF 18, U.S.A. (1995). pp: 1982-1984.
22. The Merck Index. Twelfth edition. 1996. pp: 561-562.
23. Ostle, B. Statistic in Research. Third Edition. Press/Ames. Iowa. (1975). pp: 302 – 306.
24. Journal of Validation Technology. Validation of Analytical Methodology . Vol. 3 May.1997. pp: 275-280.
25. Pharma News. Actualización en Tecnología Farmacéutica. "Procedimientos de Validación, parámetros y criterios de aceptación".Vol. 1 . No. 6, México (1990).