



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.**

TESIS DE LICENCIATURA

**Desarrollo y evaluación de las pruebas de desempeño de un
método analítico para la cuantificación de Paracetamol y
Clorhidrato de fenilefrina en una solución oral, por
espectrofotometría Ultravioleta.**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA.**

PRESENTA:

Guadalupe García Ramírez.

Director de tesis: QFB. Teresa Benítez Escamilla.

Asesor de tesis: M. en C. A. Lourdes Castillo Granada.





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.

AGRADECIMIENTOS

*Gracias a mi madre, hermanos y cuñados,
porque con su apoyo contribuyeron a éste logro,
que comenzó siendo un sueño.*

*Gracias a cada uno de los profesores que colaboró
con mi formación académica y personal, para
llegar hasta éste punto de mi vida.*

*Gracias a mi pareja y a sus padres por su apoyo
incondicional en la elaboración de este proyecto.*

ÍNDICE.

	Pag.
INTRODUCCIÓN	1
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	2
I. ANTECEDENTES TEÓRICOS	3
A. Forma farmacéutica	3
1. Solución	3
a. Ventajas y desventajas	3
b. Componentes	4
c. Método de fabricación	5
B. Principios activos	5
1. Paracetamol	5
a. Propiedades físico-químicas	5
b. Usos terapéuticos	7
c. Farmacocinética	7
d. Toxicidad	8
2. Clorhidrato de fenilefrina	8
a. Propiedades físico-químicas	8
b. Usos terapéuticos	9
c. Farmacocinética	10
d. Toxicidad	10
C. Espectrofotometría UV- Visible	10
1. Generalidades	10
a. Absorción	11
b. Estructura molecular	12
c. Espectros	12
d. Ley de Beer	13
e. Derivadas espectrales	14
f. Instrumentos	16
1) Componentes	16
2) Tipos de instrumentos	17
D. Extracción líquido-líquido	18
1. Efectos del pH	20
E. Validación	21
1. Definición	21
2. Características de desempeño	22
a. Adecuabilidad del sistema	22
b. Precisión del sistema	23
c. Linealidad del sistema	23

d. Especificidad	24
e. Exactitud	24
f. Linealidad del método	24
g. Precisión del método	25
h. Límite de detección	26
i. Límite de cuantificación	26
k. Estabilidad analítica de la muestra	26
j. Robustez	27
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
III. OBJETIVOS	29
IV. HIPÓTESIS	30
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL	31
A. Material	31
B. Equipo	31
C. Instrumento	31
D. Sustancias de referencia	32
E. Reactivos	32
F. Soluciones	32
G. Insumos	32
H. Procedimiento	33
VI. RESULTADOS	36
A. Métodos evaluados	36
B. Descripción de los métodos analíticos desarrollados	38
C. Pruebas de desempeño para Clorhidrato de fenilefrina	40
1. Linealidad del sistema	40
2. Precisión del sistema	41
3. Especificidad	42
4. Linealidad del método	42
5. Exactitud	43
6. Reproducibilidad	44
7. Estabilidad analítica de las muestras	44
D. Pruebas de desempeño de Paracetamol	46
1. Linealidad del sistema	46
2. Precisión del sistema	47
3. Especificidad	48
4. Linealidad del método	48
5. Exactitud	49
6. Reproducibilidad	50
7. Estabilidad analítica de las muestras	50
8. Robustez	51

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
VIII. CONCLUSIÓN	55
IX. SUGERENCIAS	56
X. ANEXOS	57
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

INTRODUCCIÓN.

El paracetamol es un fármaco con propiedades terapéuticas tales como analgésico y antipirético, en algunos casos es formulado en presentaciones farmacéuticas con clorhidrato de fenilefrina, útil para la descongestión nasal; por ello puede ser empleado en resfriados comunes y en otras infecciones virales. Aunque el paracetamol es considerado como un fármaco noble, el uso prolongado de este puede causar daños hepáticos y renales muy graves.

Para establecer que una forma farmacéutica es confiable debe de pasar controles de calidad que demuestren su eficacia; la valoración es un control importante que en muchos casos se realiza por espectrofotometría, ya que muchos fármacos poseen la característica de absorber energía a diferentes longitudes de onda, propio de su estructura molecular. Tanto el paracetamol como el clorhidrato de fenilefrina al tener pares de electrones libres y electrones de doble enlace conocidos como electrones π muestran esta característica útil para su posible análisis cuantitativo. Aunque los fundamentos de espectrofotometría UV son muy utilizados en el desarrollo de métodos analíticos, resulta que no siempre los fármacos se encuentran inmersos en una matriz simple que facilite su análisis, es entonces cuando se recurre a otras características físico-químicas que generalmente le confieren sus grupos funcionales, para hacer posible su separación de la matriz.

Tras el desarrollo en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza, de una nueva formulación de Paracetamol y Clorhidrato de fenilefrina en solución oral con concentración de 100 mg/mL y 2 mg/mL respectivamente, fue necesario realizar un método analítico para cuantificar los fármacos involucrados, y de esta manera complementar el control de calidad del nuevo producto.

A través de un proceso en el cual se probaron diversas técnicas establecidas, se desarrollaron dos métodos analíticos que cuantifican independiente y específicamente a cada uno de los principios activos involucrados en la solución oral. El adecuado funcionamiento de cada uno de los métodos se confirmó con la evaluación de los parámetros de desempeño, que revelan la reproducibilidad y exactitud de las cuantificaciones que resultan de estos, hecho importante para confirmar la veracidad de los contenidos de principio activo que se reportan en los marbetes y que contribuyen de manera directa en la calidad del producto.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

UV	Ultravioleta	%R	Porcentaje de recobro
r²	Coefficiente de determinación	h	Horas
CV	Coefficiente de Variación	Σ	Sumatoria
ε	Coefficiente de absortividad molar	S	Desviación estándar
E%, 1cm	Coefficiente de absortividad porcentual	\bar{Y}	Promedio de las muestras
nm	nanómetros	n	Número de muestras
μm	micrómetros	TA	Temperatura Ambiente
IC	Intervalo de Confianza	TR	Temperatura de Refrigeración
IC_{pendiente}	Intervalo de Confianza de la pendiente	λ	Longitud de onda
IC_{ordenada}	Intervalo de Confianza de la ordena al origen	λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorbancia
IC_{%R}	Intervalo de Confianza del porcentaje de recobro	λ_{min}	Longitud de onda de mínima absorbancia
 d 	Diferencia absoluta		
LD	Límite de detección		
LC	Límite de cuantificación		
m	Pendiente		
b	Ordenada al origen		

I. ANTECEDENTES TEÓRICOS.

A. Forma Farmacéutica.

1. SOLUCIÓN.

Preparado líquido claro y homogéneo obtenido por disolución del o los fármacos y aditivos en agua y que se utiliza externa o internamente. Las soluciones inyectables, oftálmicas y óticas deben ser estériles y libres de partículas.¹

Vía de administración: oral, parenteral, oftálmica, tópica, rectal, ótica.

Consideraciones de uso: inyectable, para diálisis peritoneal, para enema.¹

a. Ventajas y desventajas.

Ventajas.

- Se pueden usar para niños, pacientes psiquiátricos, pacientes de edad avanzada, que no pueden deglutir las formas farmacéuticas sólidas.²
- Las dosis pueden ser fácilmente ajustables a dosis fraccionadas por dilución.³
- Debido a que las soluciones son mezclas homogéneas, el fármaco es distribuido uniformemente en la formulación.³
- Los fármacos administrados en solución oral son inmediatamente disponibles en el tracto gastrointestinal para su absorción, que es mas efectiva y rápida que administrada en tableta o cápsula.³

Desventajas.

- Los fármacos en general son menos estables en medio líquido que en formas de dosificación sólidas.³
- Se requieren técnicas especiales para solubilizar los fármacos pobremente solubles.³

- Algunas veces resulta difícil enmascarar el inherente sabor amargo de algunos fármacos.³
- Los fármacos extremadamente potentes, con un índice terapéutico muy bajo no pueden formularse en soluciones orales, puesto que los pacientes pueden tener errores en la medición de la dosis.³
- No se puede administrar en pacientes inconscientes.³

b. Componentes.

Tabla 1. Componentes y aditivos de las soluciones.

Excipiente	Función	Ejemplos
Principio activo	Define la función terapéutica del medicamento.	-----
Cosolvente	Incrementan la solubilidad de las sustancias pobremente solubles en agua.	Alcohol, glicerina, sorbitol, propilenglicol.
Edulcorante	Enmascara el amargo e inaceptable sabor de los componentes de la fórmula.	Sacarosa, sorbitol, glucosa líquida, sacarina, aspartame.
Conservador	Impide la proliferación microbiana por inhibición o retraso del crecimiento.	Ésteres del ácido p-oxibenzoico, ácido benzoico, ácido sórbico, ésteres metílico y propílico (parabenos).
Amortiguadores de pH	Estabiliza el pH.	Soluciones reguladoras de fosfatos, acetatos, citratos, entre otros.
Antioxidante	Evitar la oxidación del principio activo por la oxidación propia.	Sulfitos, ácido cítrico, ácido ascórbico.
Saborizante	Enmascara el desagradable sabor del fármaco.	Ácido cítrico, tartárico, glutamato de sodio, taninos.
Colorante	Confiere color para su identificación y aceptación visual.	Amarillo de quinolina, amarillo ocaso, eritrosina, tartracina.

FEUM (2008), Swarbrick (2002)

c. Métodos de fabricación.

La mayoría del equipo utilizado en la fabricación de soluciones debe tener la capacidad de calentar y enfriar rápidamente para la disolución de los componentes de la formulación, requieren tener adecuados los sistemas de transferencia y filtración. Los equipos son hechos con material compatible y no reactivo, tal como el acero inoxidable. El diseño y construcción de los tanques facilita la limpieza del mismo.³

El método más común para fabricar es hacer una solución simple por la adición del soluto al solvente y agitar hasta formar una solución homogénea. La mayoría de los materiales utilizados pueden disolverse simplemente por agitación, pero puede emplearse calor y un alto grado de agitación, cuando se requieren soluciones más concentradas o cuando el soluto se disuelve lentamente.³

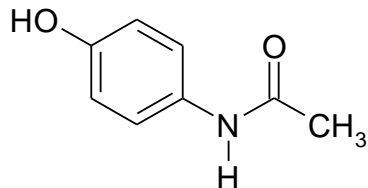
Los excipientes son adicionados en un orden específico, para incrementar la velocidad de disolución, los solutos presentes en cantidades pequeñas particularmente tinturas y otros intensificadores del color, deben ser disueltos antes de ser mezclados con la porción principal del lote, para asegurar su completa disolución, debido a que si son adicionados directamente al volumen de disolvente presente en el tanque, pequeñas cantidades emigran al fondo de este dificultando la disolución completa.³

La mayoría de las soluciones son filtradas y clarificadas, esta etapa es llamada limpieza, una alta limpieza requiere la remoción de partículas mayores o iguales a 3 nm., para ello los filtros utilizados en la manufactura, proceso o acondicionamiento de soluciones destinadas al consumo humano no deben liberar fibras.³

B. Principios activos.

1. PARACETAMOL.

a. Propiedades físico-químicas.



Sinónimos: Acetaminofen, N- acetil-*p*-aminofenol, 4-Hidroxiacetanilida.^{4,5}

Polvo cristalino blanco e inodoro, muy poco soluble en agua fría, cloroformo, considerablemente mas soluble en agua caliente, soluble en etanol, en metanol, dimetilformamida, acetona, acetato de etilo, dicloruro de etilo, poco soluble en éter; prácticamente insoluble en éter de petróleo y benceno.^{1, 4}

Peso molecular: 151.16g/mol.⁶

Punto de fusión: 169-170.5 °C.⁴

pka. 9.5 a 25 °C.⁴

pH Entre 5.1 y 6.5 (Solución al 10 % p/v).¹

Absorción ultravioleta: 250 nm en etanol, con ϵ 13800; 249 nm en metanol, con E%,1cm 900; 245 nm en agua ácida con E%,1cm 668; 257 nm en solución alcalina, con E%,1cm 715.^{4, 5}

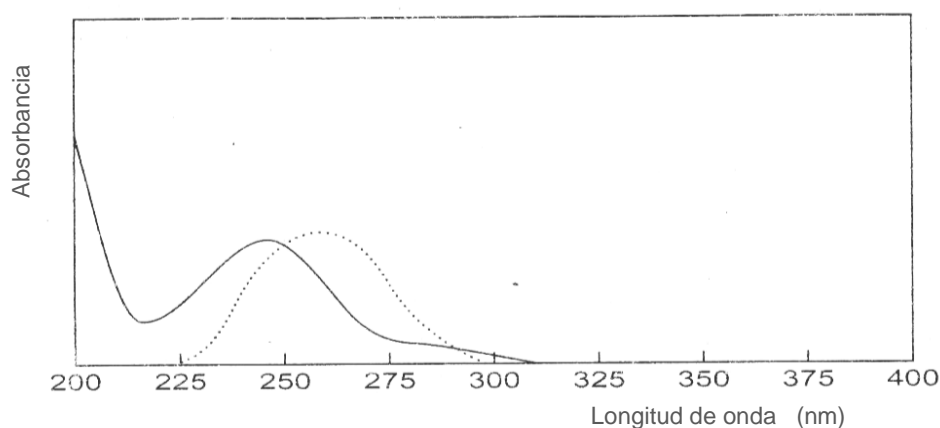


Figura 1. Espectro ultravioleta del paracetamol.⁴

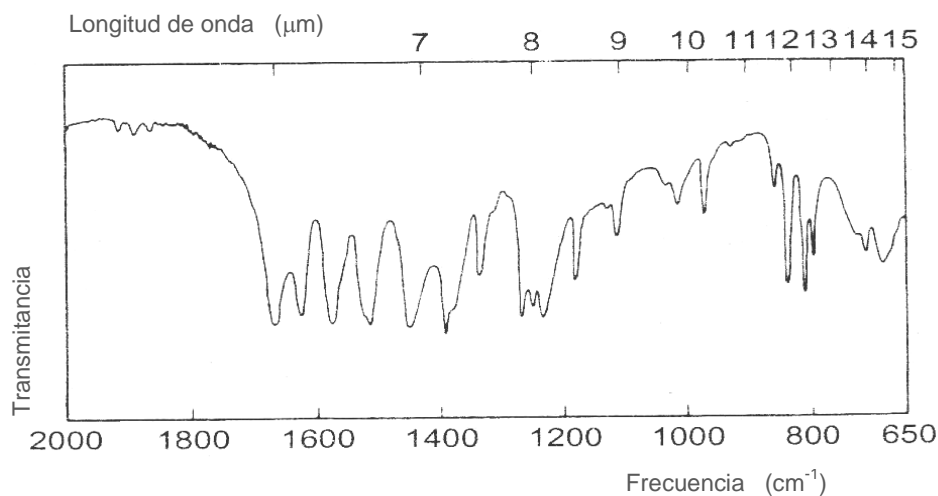


Figura 2. Espectro infrarrojo en KBr. Los principales picos se muestran en 1506, 1657, 1565, 1263, 1227, 1612 cm^{-1} .⁴

b. Uso terapéutico.

Antipirético y analgésico, reduce la fiebre por acción en el centro regulador de la temperatura en el hipotálamo y produce analgesia por elevación del umbral del dolor. Es útil en enfermedades acompañadas de dolor, malestar y fiebre, como el resfriado común y otras infecciones virales, se usa en pacientes que experimentan reacciones adversas a la aspirina. El acetaminofen carece de actividad antiinflamatoria. No altera las concentraciones de ácido úrico y carece de actividad antiagregante plaquetaria.⁶

c. Farmacocinética.

El paracetamol se absorbe fácilmente en el tubo digestivo, lo cual está relacionado con el vaciamiento gástrico y sus concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan aproximadamente entre los 30 y 60 min después de la administración oral. Se distribuye a la mayoría de los tejidos corporales. Atraviesa la barrera placentaria y se encuentra en la leche materna. Su grado de unión a las proteínas plasmáticas es insignificante a las concentraciones mayores. La semivida de eliminación del paracetamol oscila entre 1 y 3 h.⁷

El paracetamol se metaboliza fundamentalmente en el hígado por las enzimas microsomales y se excreta por la orina principalmente en forma de sus conjugados glucurónido y sulfato. Menos del 5 % se elimina en forma de paracetamol intacto. Un metabolito hidroxilado menor (*N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina), que se produce habitualmente en muy pequeñas cantidades por acción de las oxidasas de funciones mixta hepáticas y renales, y que suele desintoxicarse por conjugación con glucation, puede acumularse tras la sobredosis de paracetamol y causar lesiones tisulares en hígado y riñón.⁸

Estudios han demostrado que la administración simultánea de paracetamol con ranitidina aumenta significativamente sus concentraciones plasmáticas, y por el contrario disminuye las de su conjugado glucurónido.⁹

El paracetamol se administra por vía oral o en supositorios rectales para el dolor leve o moderado y para bajar la fiebre. La dosis habitual por vía oral en el adulto es de 0.5 a 1g cada 4 o 6 h, hasta un máximo de 4g diarios. Las dosis habituales en niños son: menores de 3 meses, 10 mg/kg; de 3 meses a 1 año, de 60 a 120 mg; de 1 a 5 años, de 120 a 250 mg; de 6 a 12 años, de 250 a 500mg. Estas dosis pueden administrarse cada 4 o 6 h, en caso de ser necesario, hasta un máximo de cuatro dosis en 24 h.⁷

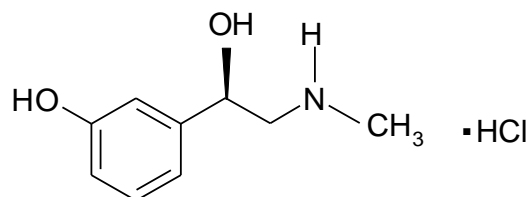
Comercialmente se encuentran las soluciones de paracetamol solo y combinado con clorhidrato de fenilefrina y maleato de clorfenamina, como por ejemplo FLAVIT-AV (Laboratorios HORMONA S.A. de C.V.) y FLUVIATOL * NF (Laboratorios BOEHRINGER INGELHEIM PROMECO, S.A. de C.V.).¹⁰

d. Toxicidad.

La mínima dosis letal es de aproximadamente 10g en una sola dosis, aunque los síntomas de daño hepático que incluyen náuseas, vómito, diarrea y dolor abdominal no aparecen en menos de 12 h después de la sobredosis, pudiendo prolongarse hasta 4 o 6 días, se ha observado necrosis hepática y muerte por sobredosis; el daño hepático es probable si un adulto toma mas de 10 a 15 g en una dosis única, o si un niño de 2 años toma mas de 3 g. Las drogas que estimulan el metabolismo, como el fenobarbital, fenitoína y el alcohol potencian la hepatotoxicidad inducida por el paracetamol.^{4,6}

2. CLORHIDRATO DE FENILEFRINA.

a. Propiedades físico-químicas.



$C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$

Clorhidrato de (R)-1-(3-hidroxifenil)-2-metilaminoetanol.¹

Sinónimos: Mesatonium, Cloruro de metaoxidrina, Alconefrina, Neo-sinefrina, Nostril.^{5,7}

Polvo cristalino blanco o casi blanco. Fácilmente soluble en agua y en alcohol, casi insoluble en éter etílico.¹

Peso molecular: 203.67g/mol.⁶

Punto de fusión: 140-145 °C.²

pk_1 : 8.7 pk_2 9.84⁵

pH entre 4.5 y 5.5 determinado en una solución acuosa 1:100.¹

Rotación específica: entre - 42 a - 47.5° (determinación en una solución 1:100).¹

Absorción ultravioleta: 273nm en agua ácida con E%,1cm 110; 238nm con E%,1cm 534 y 291nm con E%,1cm 182 en solución alcalina.⁴

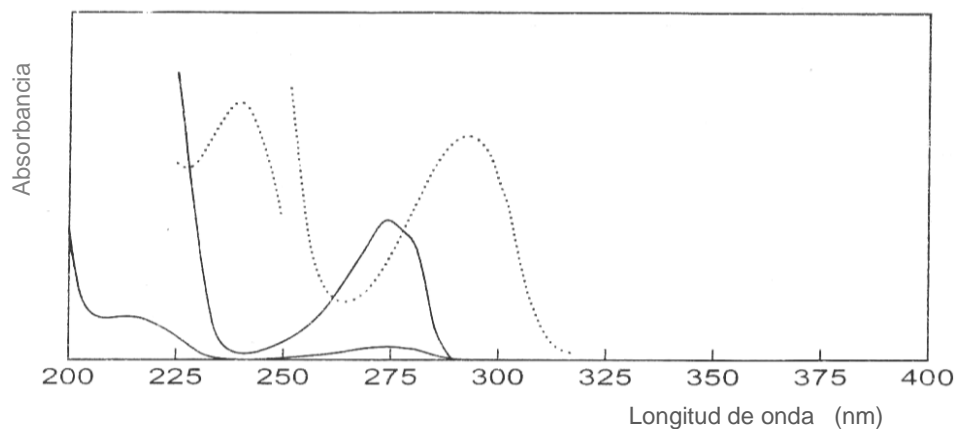


Figura 3. Espectro ultravioleta del clorhidrato de fenilefrina.⁴

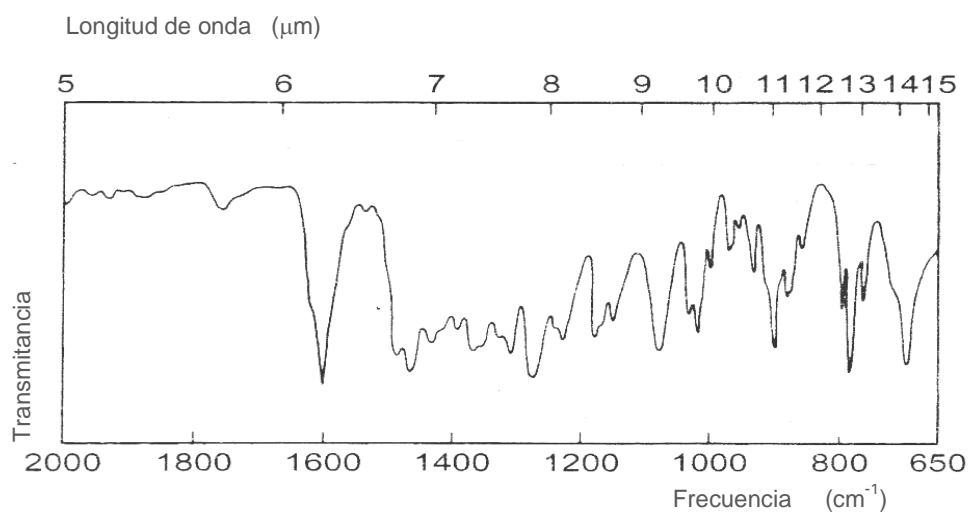


Figura 4. Espectro infrarrojo en KBr, con principales picos en 1594, 1273, 784, 696, 1304, 900 cm^{-1} .⁴

b. Usos terapéuticos.

Se utiliza para el mantenimiento de la presión sanguínea y como descongestivo nasal, escleroconjuntival y uveal. También se utiliza como agente midriático eficaz que se emplea con frecuencia para facilitar el examen de la retina y para aumentar el flujo de salida del humor acuoso en el tratamiento de glaucoma de ángulo abierto. Sus propiedades vasoconstrictoras determinan que se le incluya en preparaciones anestésicas locales o espinales para prolongar la acción de estos compuestos. Es activo por vía oral.^{6,8}

c. Farmacocinética.

La Fenilefrina tiene una baja biodisponibilidad oral debido a la absorción irregular y al metabolismo de primer paso por las monoaminooxidasas en el intestino y el hígado, es metabolizada por conjugación con sulfato y ácido glucoronico. Alrededor del 80% de una dosis oral es excretada en la orina en 24 h principalmente conjugada con sulfato y *m*- hydroxyphenylglycol, la vida media es de 2 a 3 h.⁷

Cuando se inyecta por vía subcutánea o intramuscular tarda de 10 a 15 min en actuar; las inyecciones subcutáneas e intramusculares son efectivas hasta alrededor de 1 y 2 h, respectivamente. Las inyecciones intravenosas son efectivas durante unos 20 min. La absorción generalizada se produce tras la administración tópica.⁷

La fenilefrina y sus sales se emplea a menudo para el alivio sintomático de la congestión nasal, se incluyen habitualmente en preparados farmacéuticos destinados al alivio de síntomas de tos y resfriado, administrándose por vía oral una dosis de 5 a 20 mg 3 o 4 veces al día.⁷

Comercialmente se encuentra las soluciones compuestas de clorhidrato de fenilefrina con paracetamol y maleato de clorfenamina, con el nombre de FLAVIT-AV (Laboratorios HORMONA S.A. de C.V.) y FLUVIATOL * NF (Laboratorios BOEHRINGER INGELHEIM PROMECO, S.A. de C.V.).¹⁰

d. Toxicidad.

La dosis letal mínima para niños menores de dos años es de 100 mg intranasales y 1 g para adultos en una sola administración. La Fenilefrina, como una respuesta vasopresora excesiva puede causar un aumento prolongado de la presión arterial. Induce taquicardia o bradicardia refleja y debe, por tanto, evitarse en el hipertiroidismo grave y emplearse con precaución en la cardiopatía isquémica grave.^{4,7}

Debido a que la Fenilefrina se absorbe a través de la mucosa, es posible que se produzca efectos generalizados tras su aplicación en los ojos o en la mucosa nasal. El clorhidrato de fenilefrina es irritante y es posible que cause malestar local en el lugar de la aplicación; la extravasación de la inyección llega incluso a provocar necrosis tisular local.⁷

C. Espectrofotometría UV-Visible.

1. GENERALIDADES

La espectroscopia de absorción, estudia el tipo y cantidad de radiación absorbida por las moléculas, la cual está sujeta al número de moléculas que interaccionan con la radiación.

Una de las formas en como se presenta la energía es la radiación electromagnética, de la cual la luz visible constituye una parte, uno de los términos utilizados para referirse a las ondas es la longitud de onda (λ), la cual se define como la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente. La dimensión de la onda se refiere a una longitud expresada generalmente en nanómetros (nm) equivalente a 10^{-9} m.¹¹

El espectro electromagnético es el total de intervalos de longitudes de onda que constituyen la radiación electromagnética, en la tabla 2 se muestra un segmento del espectro electromagnético.¹¹

Tabla 2. Segmento del espectro electromagnético.

Regiones	Intervalo
Ultravioleta lejano	100-200 nm
Ultravioleta	200-400 nm
Visible	400-750 nm
Infrarrojo cercano	0.75-4 μ m
Infrarrojo	4 – 25 μ m

Connrs(1981)

a. Absorción.

Todas las moléculas poseen energía, lo cual se debe a 1) la molécula se mueve como un todo, esto se conoce como *translación*, por lo que la energía asociada a este fenómeno se conoce como translacional, 2) los átomos o grupos de átomos, se mueven cada uno con respecto a los demás produciendo energía de vibración, 3) la molécula puede rotar alrededor de un eje, y tal rotación se caracteriza por la energía de rotación, 4) La energía electrónica que depende del estado electrónico de la molécula.¹¹

Si la molécula pasa desde uno de sus niveles de energía permitidos hasta otro mas bajo, se ha de liberar cierta energía. Esta energía se puede perder como radiación, y entonces se ha producido emisión de radiación. Si por el contrario, una molécula encuentra una radiación electromagnética de longitud apropiada, de manera que la energía de la molécula se eleve desde un nivel de energía a otro superior, se dice que ha ocurrido una absorción de radiación.¹¹

b. Estructura molecular.

En las moléculas orgánicas son importantes cuatro tipos de electrones. 1) Electrones corticales, que no participan en los enlaces, los cuales poseen gran energía de excitación y no contribuyen a la absorción en las regiones ultravioleta y visible. 2) Electrones de enlaces covalentes sencillos que ocupan orbitales σ y que se conocen como electrones σ , tienen alta energía de excitación, y en ultravioleta lejano se observa la absorción debida a transiciones en que intervienen electrones σ . 3) Electrones apareados como los de Oxígeno, azufre, nitrógeno y halógenos, conocidos como electrones n , que pueden originar absorción en la región ultravioleta. 4) Electrones en orbitales π , como en los dobles y triples enlaces, que son responsables de muchas de las absorciones en las regiones ultravioleta y visible.¹¹

Una molécula posee, además de orbitales ocupados, orbitales sin ocupar (orbitales antienlazantes). El orbital mas bajo sin ocupar de una molécula suele ser un orbital π^* , y los orbitales ocupados superiores son orbitales n y orbitales π . Las transiciones electrónicas más comunes son las que se llevan a cabo entre orbitales n y π hasta orbitales π^* antienlazantes; éstas se simbolizan como transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$.¹¹

El desnivel energético entre los niveles de energía del estado fundamental y del estado excitado para la transición determina la longitud de onda de absorción.¹¹

Se ha desarrollado cierta terminología especializada para describir las relaciones espectro-estructura. Un *cromóforo* es un grupo responsable de la absorción de la luz por una molécula; por tanto, la mayoría de los cromóforos tienen uno o más enlaces múltiples. Un *auxocromo* es un grupo que no posee propiedades de absorción notables por si mismo, pero que aumenta la absorción ocasionada por un cromóforo situado en otra parte, debido a que contienen átomos con pares de electrones libres que interaccionan electrónicamente con un cromóforo próximo (los grupos hidroxilo y amino se desenvuelven como auxocromos).¹¹

Un desplazamiento *batocrómico* es un desplazamiento del máximo de la banda hacia longitudes de onda mayores, también conocido como desplazamiento al rojo, esto se debe a una variación del medio o de la estructura molecular. Un desplazamiento *hipsocrómico* (desplazamiento al azul) es un desplazamiento a longitudes de onda mas cortas. El *hipercromismo* es un incremento del coeficiente de absorptividad (constante que se refiere a la absorbancia de una sustancia con concentración determinada), originado por una variación estructural o del medio y el *hipocromismo* es un descenso en el coeficiente de absorptividad.^{11, 12}

c. Espectros.

Los espectros son gráficas de la extensión de la absorción de luz en función de la longitud de onda de la luz, por lo que se determina un espectro midiendo la absorbancia o transmitancia de una solución con respecto a la longitud de onda. Los espectros ultravioleta y visible a menudo se representan trazando la absorbancia (eje de ordenadas) respecto a la λ como muestra la figura 5.¹¹

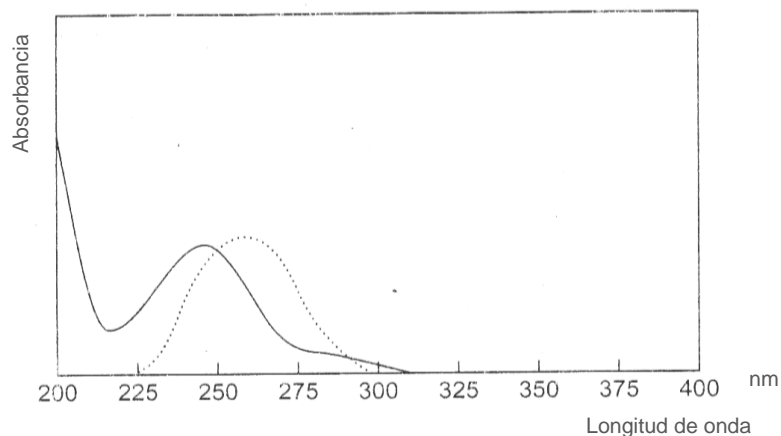


Figura 5. Espectro de absorción ultravioleta del Paracetamol en solución ácida ____ y solución básica⁴

Las longitudes de onda que corresponden al máximo y mínimo en la gráfica se simbolizan por λ_{\max} y λ_{\min} .¹¹

La cantidad de luz absorbida a determinada longitud de onda está relacionada con el número de moléculas que absorben la radiación, por ello los espectros de absorción se emplean como medios de análisis cuantitativo.¹¹

d. Ley de Beer.

Se observa que si se hace pasar luz monocromática a través de una capa de solución de espesor db el descenso en la intensidad de la luz, dI , como consecuencia de su paso a través de la solución, es directamente proporcional a la intensidad I de la radiación, a la concentración c de las especies absorbentes y al espesor, db , de la capa de solución, expresado matemáticamente de la siguiente forma:

$$-dI = kIc db$$

Reordenando e integrando queda

$$I = I_0 e^{-kbc}$$

Pasando a logaritmos decimales

$$I = I_0 10^{-abc}$$

Donde $a = k / 2.303$. La ecuación también se puede expresar de las siguientes formas:

$$\text{Log } I_0/I = abc, \quad \text{o} \quad A = abc,$$

Las cantidades espectroscópicas que se miden son la transmitancia T , donde $T = I / I_0$, y la absorbancia, A , donde $A = \log (1 / T)$. La ecuación más utilizada para establecer la absorbancia, A , de

una solución es la última, donde A es directamente proporcional a la concentración c , del soluto absorbente.¹¹

La absorptividad a es una constante de proporcionalidad que se refiere a la absorbancia de una solución de concentración molar o porcentual, es independiente de la concentración, paso de la luz y radiación de la luz incidente, pero sí depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular y longitud de onda de la radiación; las unidades de la absorptividad se determinan a partir de las unidades de b (espesor de la celda) y c . Cuando b está en cm y c en gramos por litro la absorptividad se expresa en litro por gramo-centímetro, si c está en moles, entonces se conoce como absorptividad molar y se representa como ϵ , siendo sus unidades litros por mol-centímetros; pero si c se expresa en porcentaje peso/volumen ($\text{g}/100\text{mL}$) la absorptividad se escribe $A^{1\%}$ o $E\%, 1\text{cm}$.¹¹

e. Derivadas espectrales.

Las derivadas espectrales pueden ser usadas para aumentar las diferencias entre espectros, para resolver el traslape de las señales en el análisis cualitativo, y más importante para reducir los efectos de interferencia de la matriz u otros componentes que absorben en el análisis cuantitativo. Las curvas de derivadas espectrales de orden par son mucho más estrechas y, por lo tanto, permiten una mayor resolución para discriminar dos componentes.^{13, 14}

La primera derivada es el coeficiente de absorptividad contra la longitud de onda. Esta empieza y finaliza en cero, pasando a través de cero en la misma λ_{max} de la señal de absorción de la derivada cero. Esta derivada tiene una señal positiva y una señal negativa con un máximo y mínimo en la misma longitud de onda que el punto de inflexión de la señal de la derivada cero, esto se puede observar en la figura 6.¹³

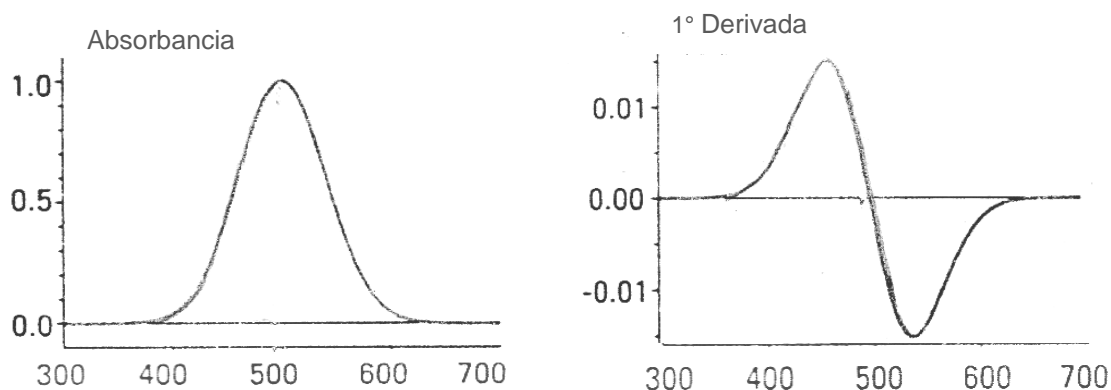


Figura 6. Espectro comparativo entre un espectro de derivada cero y la primera derivada.¹³

La característica mas distintiva de la derivada de segundo orden es una señal negativa con un mínimo en la misma λ_{\max} que en la señal de orden cero, figura 7. Esta derivada también muestra dos señales satélite positivas en cada uno de los lados de la señal principal. La cuarta derivada muestra una señal positiva con un máximo en la λ_{\max} de la de orden cero figura 7. Si se cumple la ley de Lambert-Beer en el espectro fundamental, la amplitud, es decir la distancia entre un máximo y un mínimo de una señal de un espectro derivado, también es proporcional a la concentración, por otra parte la amplitud es inversamente proporcional a la anchura de la señal del espectro fundamental también conocido como de orden cero.¹³

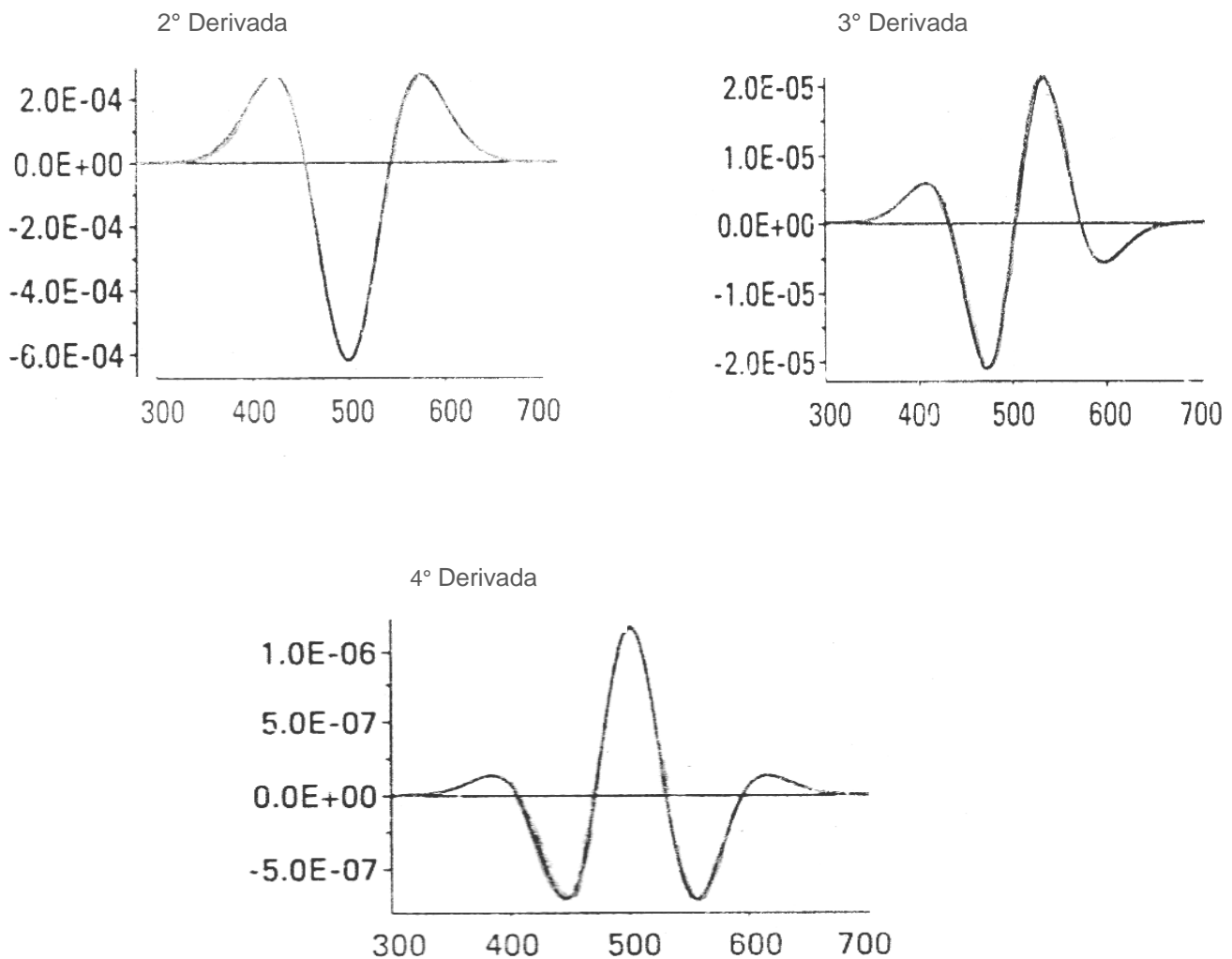


Figura 7. Espectros de la segunda, tercera y cuarta derivada.¹³

f. Instrumentos.

1) Componentes. Los instrumentos para medir la radiación ultravioleta y visible están constituidos por los siguientes componentes: 1) Fuente, 2) selector de longitud de onda, 3) recipiente para la muestra, 4) detector de radiación, 5) procesadores de señal y dispositivos de lectura.¹⁵

Dentro de la fuente se encuentran las lámparas de deuterio e hidrógeno. La excitación eléctrica del deuterio o hidrógeno a baja presión produce un espectro continuo en la región ultravioleta, ambas lámparas tanto la de deuterio como la de hidrógeno producen un espectro continuo útil para la región comprendida entre los 160 y 375 nm. A longitudes de onda más largas (> 400 nm), las lámparas producen líneas de emisión que se superponen sobre el espectro común.¹⁵

Las lámparas de filamento de Wolframio, es la fuente más común de radiación visible y del infrarrojo cercano, que se encuentra en la región de longitud de onda comprendida entre los 350 y 2500 nm.¹⁵

Las lámparas de arco de xenón producen una radiación intensa como consecuencia del paso de una corriente a través de una atmósfera de xenón. El espectro es continuo en un intervalo comprendido entre 200 y 1000 nm con el máximo de intensidad a aproximadamente 500 nm.¹⁵

Selectores de longitud de onda. Las radiaciones emitidas por la fuente se dispersan mediante una red plana o cóncava que forma parte de un montaje denominado monocromador. Un monocromador está constituido por 1) ranura o rendija de entrada, 2) una lente o espejo colimador que produce un haz paralelo de radiación, 3) un prisma o una red que dispersa la radiación en las longitudes de onda que la componen, 4) un elemento de enfoque que reforma la imagen de la ranura de entrada y la enfoca sobre una superficie denominada *plano focal* y 5) una rendija de salida en el plano focal que aísla la banda espectral deseada.^{15, 16}

Existen dos tipos de dispersores en los monocromadores, redes y prismas. Una radiación que entra al monocromador por medio de una abertura rectangular angosta o rendija; se alinea, y luego choca contra el elemento dispersor a un cierto ángulo. En el monocromador de red, la dispersión angular de la longitud de onda es el resultado de la difracción, la cual se presenta en la superficie reflectora; en cuanto al prisma, la refracción en las dos caras da como resultado una dispersión angular de la radiación.¹⁵

Este dispositivo permite extraer, a partir de la luz emitida por la fuente, un rango estrecho de su espectro de emisión. La longitud de onda (o más exactamente el ancho de la banda espectral) seleccionada mediante el parámetro *anchura de rendija*, varía progresivamente con el tiempo debido al giro de la red.¹⁶

Recipientes de la muestra. Las celdas o cubetas que contienen a la muestra y al disolvente deben construirse de un material que deje pasar la radiación de la región espectral de interés. Para trabajar en la región ultravioleta se requiere cuarzo o sílice fundida; cualquiera de estas sustancias son transparentes en la región visible e infrarrojo. La longitud de las cubetas más común para los estudios en la región uv- visible es de 1cm.¹⁵

Detector. El detector convierte la radiación luminosa incidente en señal eléctrica. Su sensibilidad depende de la longitud de onda. Se utiliza normalmente un tubo fotomultiplicador o un semiconductor (detector de transferencia de carga o fotodiodo de silicio).¹⁶

2) Tipos de Instrumentos. Instrumentos de haz sencillo. Consta de una fuente, un filtro o un monocromador para la selección de la longitud de onda, celdas contrastadas que pueden interponerse alternativamente en el haz de radiación, un detector, un amplificador y dispositivo de lectura. Normalmente, un instrumento de haz sencillo necesita una fuente de alimentación estabilizada para evitar errores como resultado de los cambios de la intensidad del haz durante el tiempo requerido para ajustar a 100 % de T y determinar el porcentaje de T del analito.¹⁵

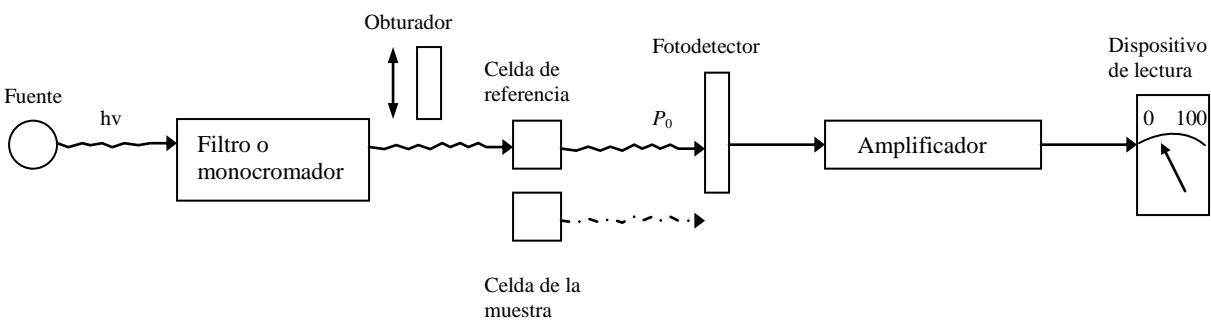


Figura 8. Diagrama de espectrofotómetro de haz sencillo.¹⁵

Instrumentos de doble haz. Mediante un espejo llamado divisor de haz, se forman dos haces en el espacio. Un haz pasa a través de la disolución de referencia y continúa hasta un fotodetector, simultáneamente el segundo atraviesa la muestra hasta un segundo detector contrastado. Las dos señales de salida se amplifican y su coeficiente o el logaritmo de este, se determina electrónicamente y se visualiza mediante un dispositivo de lectura.¹⁵

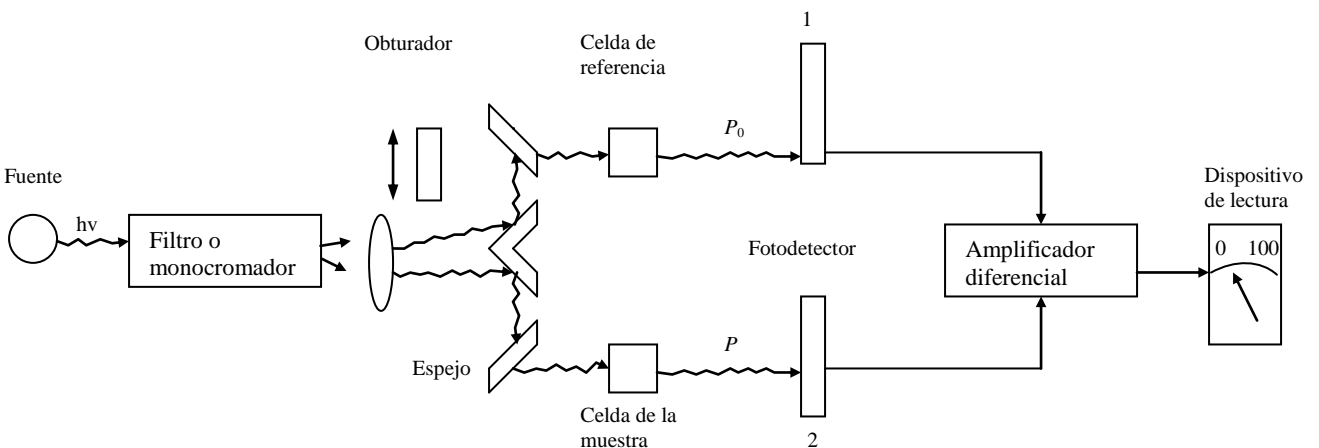


Figura 9. Diagrama de un espectrofotómetro de doble haz con haces separados en el espacio.¹⁵

Instrumentos multicanales. Es un instrumento de haz sencillo con un detector de diodos en serie. La radiación que procede de la lámpara se enfoca sobre el recipiente de la muestra o del disolvente, pasando después por el interior de un monocromador de red fija. La radiación dispersada incide en el detector de fotodiodos en serie que esta formado por una serie de cientos de fotodiodos que se han colocado a lo largo de un chip de silicio.¹⁵

En los instrumentos de diodos en serie, la anchura de la rendija del monocromador suele ser idéntica a la anchura de uno de los diodos de silicio. Así, la señal de salida de cada diodo corresponde a la radiación de una longitud de onda diferente y el espectro se obtiene barriendo estas señales de salida secuencialmente.¹⁵

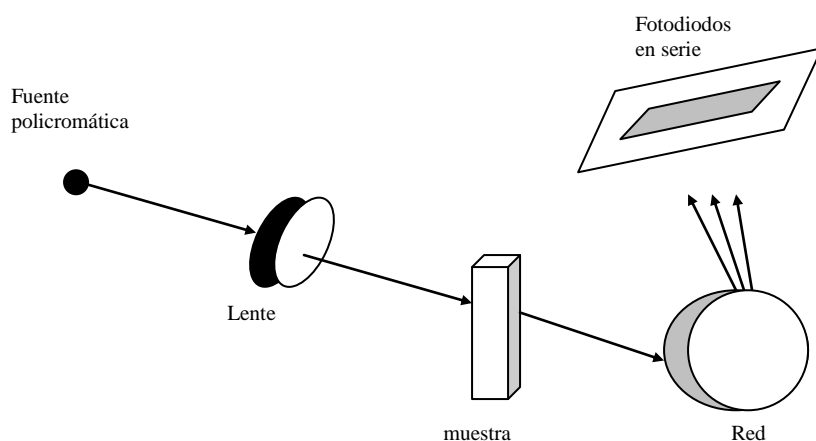


Figura 10. Diagrama de un espectrofotómetro multicanal, que consta de una red y un detector de diodos en serie.¹⁵

D. Extracción Líquido-líquido.

La extracción es usada para separar compuestos de una mezcla. La extracción líquido-líquido involucra la distribución de un compuesto llamado soluto, entre dos disolventes inmiscibles, generalmente uno de los disolventes es el agua y el otro es un solvente orgánico menos polar como diclorometano, éter, acetato de etilo o hexano. Las diferentes solubilidades de un soluto en un par de solventes, puede tener como ventaja el transporte selectivo de un compuesto de una fase a otra.¹⁷

El procedimiento de extracción en una solución acuosa usualmente involucra la agitación de esta y un disolvente orgánico inmiscible con el agua dentro de un embudo de separación, La distribución de los diferentes solutos entre la fase acuosa y la orgánica va de acuerdo con sus solubilidades.¹⁷

Cuando un compuesto orgánico dado es repartido entre un disolvente y el agua, la razón de la concentración del soluto en el disolvente con respecto a su concentración en el agua es igual a la razón de su solubilidad en ambos disolventes, esta distribución del compuesto entre uno u otro disolvente puede expresarse con la siguiente ecuación.

$$K = \frac{\text{g /mL del compuesto en la fase orgánica}}{\text{g /mL del compuesto en la fase acuosa}} = \frac{[S]_2}{[S]_1}$$

Donde K es el coeficiente de partición y S es el soluto presente en la fase 1 y 2.¹⁷

Algunos compuestos con coeficiente de partición mayor que 1.5 pueden ser separados del agua por extracciones con un disolvente orgánico insoluble en agua. Sí el coeficiente de partición entre el agua y el disolvente orgánico es mayor a 100 para un soluto, una sola extracción será suficiente para extraer al compuesto de la fase acuosa, pero si K esta entre 1 y 10 será necesario realizar múltiples extracciones.¹⁷

Suponiendo que el soluto S en un volumen V_1 expresado en mL del disolvente uno (agua) es extraído con un volumen V_2 en mL de disolvente dos (disolvente orgánico), y permitiendo que m sea los moles de S en el sistema y que q sea la fracción remanente de soluto en la fase uno durante el equilibrio, se deduce que la molaridad en la fase uno es qm/V_1 , y la fracción del soluto total transferido a la fase dos es $(1 - q)$, por lo tanto la molaridad en la fase dos es $(1 - q)m/V_2$, de tal forma que el coeficiente de partición se puede expresar como:

$$K = \frac{[S]_2}{[S]_1} = \frac{(1 - q)m/V_2}{qm/V_1}$$

de la cual podemos deducir de q :

$$\text{Fracción remanente en la fase 1 después de una extracción. } q = \frac{V_1}{V_1 + KV_2}$$

con lo cual se deduce que la fracción de soluto remanente en la fase uno depende del coeficiente de partición y de los volúmenes utilizados de disolvente. Si las fases son separadas y es adicionada una nueva cantidad de disolvente dos, la fracción de soluto remanente en la fase uno esta dada por

$$q^* q = \left(\frac{V_1}{V_1 + KV_2} \right)^2$$

después de n extracciones con un volumen del disolvente dos, la fracción remanente del soluto en la fase dos esta expresada por:

$$q^n = \left(\frac{V_1}{V_1 + KV_2} \right)^n$$

Los solutos involucrados en un mismo disolvente con una diferencia significativa en la polaridad deben tener diferentes coeficientes de partición entre disolventes polares y no polares. Un ejemplo de esto está dado por la distribución de dos compuestos orgánicos entre un disolvente polar y uno no polar, el primero es neutral y no polar, el segundo iónico y polar; Si los compuestos están disueltos originalmente en un disolvente no polar y la solución es agitada con un disolvente polar, la sustancia neutral es preferentemente distribuida en la fase no polar, mientras que el constituyente polar es preferentemente distribuido en la fase polar. Al separar las fases existe una separación eficiente de los dos solutos.¹⁸

1. EFECTOS DEL pH.

Si un soluto es un ácido o una base, su carga cambia conforme cambie el pH, usualmente una especie neutral es más soluble en un disolvente orgánico y una especie cargada es más soluble en solución acuosa.¹⁹

Considerando una amina básica cuya forma neutral B, tiene un coeficiente de partición K entre la fase acuosa 1 y la fase orgánica 2. Suponiendo que es un ácido conjugado BH⁺ soluble únicamente en la fase acuosa 1 y denotando que K_a es la constante de disociación de un ácido, el coeficiente de distribución D es definido como:

$$D = \frac{\text{Total de concentración en la fase 2}}{\text{Total de concentración en la fase 1}}$$

La cual se convierte en:

$$D = \frac{[B]_2}{[B]_1 + [BH^+]_1}$$

Sustituyendo $K = [B]_2 / [B]_1$ y $K_a = [H^+] [B]_1 / [BH^+]_1$, la distribución D de la base entre las dos fases queda.

$$D = \frac{K K_a}{K_a + [H^+]} = K \alpha_B$$

Donde α_B es la fracción de la base débil en la forma neutral de la fase acuosa. El coeficiente de distribución D es usado en lugar del coeficiente de partición K , cuando una especie genera mas de una forma química como B y BH^+ .¹⁹

Las especies cargadas tienden a ser mas solubles en agua que en disolventes orgánicos. Para extraer una base en el agua, se usa un pH lo suficientemente bajo para convertir B en BH^+ . Para extraer el ácido HA en el agua, usar un pH lo suficientemente alto para convertir HA en A^- desafiando la suposición de que el ácido AH (con constante de disociación K_a) es repartido entre la fase acuosa 1 y la fase orgánica 2. Llamando el coeficiente de partición K para HA y asumiendo que A^- no es soluble en la fase orgánica se muestra, que el coeficiente de distribución D esta dado por:

$$D = \frac{K [H^+]}{[H^+] + K_a} = K \alpha_{HA}$$

Donde α_{HA} es la fracción del ácido débil de la forma HA en la fase acuosa.¹⁹

E. Validación.

1. DEFINICIÓN.

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios de laboratorio, que las **características o pruebas de desempeño** cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.¹

La validación es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.²⁰

Deben ser validados de acuerdo a un protocolo aprobado, los métodos analíticos que se utilicen para evaluación de materias primas, evaluación de producto a granel, en proceso y terminado.²¹

Los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías.¹

Categoría I. Métodos para cuantificar a un componente específico.

Categoría II. Métodos para la determinación de impurezas.

Categoría III. Métodos para la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución, liberación controlada, entre otras).

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito.

La “Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2A, 1995” establece que los procedimientos analíticos a validar se clasifican en

- Pruebas de identificación.
- Pruebas para cuantificar contenido de impurezas.
- Pruebas para controlar el límite de impurezas.
- Pruebas para cuantificar humedad activa en muestras de una sustancia farmacéutica, producto farmacéutico u otro componente en el producto farmacéutico.²²

2. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO.

Las características de desempeño habituales que se deben considerar en la validación de métodos analíticos son: Exactitud, precisión, especificidad, Límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y robustez.²³

En la tabla 3 se muestran las pruebas de desempeño específicas para cada categoría de de método a evaluar.

Tabla 3. Pruebas de desempeño a evaluar durante la validación de métodos analíticos.

Características de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativas	Pruebas límite		
Verificación del sistema	*	*	*	*	NO
Precisión del sistema	SI	SI	*		NO
Linealidad del sistema	SI	SI	*	*	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Exactitud del método	SI	SI	*	*	NO
Linealidad del método	SI	SI	*	*	NO
Precisión del método	SI	SI	NO	SI	NO
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Robustez	*	*	*	*	*

*Puede ser necesario dependiendo de la naturaleza del método.
FEM(2008)

a. Adecuabilidad del sistema (Verificación del sistema).

La adecuabilidad del sistema es la verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancias de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de un método analítico es una prueba necesaria para los métodos cromatográficos. Se

realiza inyectando por quintuplicado la solución de adecuabilidad, se reporta la respuesta del analito, se calcula el CV y para cada muestra se informa el factor de capacidad (K), la resolución (R), la retención relativa (Rr), el factor de coleo y el número de platos teóricos.²⁴

Criterios de aceptación.²⁴

$CV \leq 2\%$ para la respuesta analítica

Valores superiores deben ser justificados, para cada inyección se recomienda:

$K > 2$, $R > 2$, $T < 2$

b. Precisión del sistema.

La Precisión del sistema es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.¹

A partir de una sustancia de referencia, el analista debe preparar por lo menos seis soluciones que representen al 100% de la cantidad o concentración del analito en la muestra, ya sea, por dilución o pesadas independientes y medir la respuesta dentro de una misma corrida analítica.¹

Criterios de aceptación.²⁴

$CV \leq 1.5\%$ para métodos físico-químicos.

$CV \leq 3\%$ para métodos biológicos.

c. Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica.¹

Se determina investigando la relación concentración-respuesta en un intervalo que incluya por lo menos cinco niveles, por triplicado, de la concentración del analito.¹

Criterios de aceptación.²⁴

$r^2 \geq 0.98$

IC_{pendiente} no debe incluir al cero.

d. Especificidad.

La especificidad es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra tales como impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra.¹

Se determina mostrando resultados positivos con muestras que contengan el analito, resultados negativos para muestras que no contienen dicho analito y la confirmación de que no se obtiene respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada con el analito.²³

e. Exactitud.

La exactitud de un método analítico, es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra.¹

Puede determinarse por la aplicación del método analítico, a placebos o muestras adicionales preparados de manera independiente, al menos por sextuplicado, obtenidas por medio de un procedimiento específico, dichas muestras deben contener todos los componentes del producto y además se le debe adicionar la concentración de analito que represente el 100%.¹

Criterios de aceptación.²⁴

El $IC_{\%R}$ debe incluir el 100%

El promedio del % de recobro debe estar incluido en el siguiente intervalo:

98 - 102% en métodos cromatográficos o volumétricos.

97 - 103% en métodos espectrofotométricos.

95 - 105% para métodos microbiológicos.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor al:

2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

3% para métodos espectrofotométricos.

5% si es microbiológico.

f. Linealidad del método.

La linealidad del método es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado.²⁴

Se determina por la aplicación del método analítico, a una muestra (placebo adicionado o muestra adicionada de analito), obtenida de acuerdo a un procedimiento específico para su preparación. Dicha muestra debe ser preparada al menos a tres niveles de concentración del analito por triplicado, para ser analizadas aplicando el método analítico.¹

Criterios de aceptación.²⁴

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

$$r^2 \geq 0.98$$

IC_{pendiente} debe incluir la unidad.

IC_{ordenada} debe incluir el cero.

El CV_{y/x} no debe ser mayor al:

2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

3% para métodos espectrofotométricos.

5% si es microbiológico.

Porcentaje de recobro.

El IC_{%R} debe incluir el 100%

El promedio del % de recobro debe estar incluido en el siguiente intervalo:

98 - 102% en métodos cromatográficos o volumétricos.

97 - 103% en métodos espectrofotométricos.

95 - 105% para métodos microbiológicos.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor al:

2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

3% para métodos espectrofotométricos.

5% si es microbiológico.

g. Precisión del método.

La precisión del método analítico es la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en diferentes días.²⁴

Para Realizarla se analiza por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano al 100%, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes, utilizando de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos.²⁴

Criterio de aceptación.²⁴

CV \leq 2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

CV \leq 3% para métodos espectrofotométricos.

CV \leq 5% si es biológicos.

h. Límite de detección.

El límite de detección es la cantidad mínima de analito en un amuestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de aplicación del método.¹

Este procedimiento aplica a métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal. Un analista debe determinar la respuesta de muestras blanco (reactivos, placebo, etc.) y la respuesta de muestras analíticas en un intervalo de concentraciones del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite. Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos de 3 a 1. Lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección.²⁴

Criterio de aceptación.²⁴

El LD debe ser menor a la especificidad de la prueba de impurezas límite.

i. Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación es una característica de desempeño analítico, que determina la capacidad cuantitativa del método a concentraciones bajas del analito en la muestra y se debe determinar en los métodos cuantitativos categoría II.¹

Este procedimiento aplica a métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal. Un analista debe determinar la respuesta de muestras blanco (reactivos, placebo, etc.) y la respuesta de muestras analíticas a concentraciones conocidas del analito, inferiores o que incluya la especificación del contenido de la prueba de impurezas. Determinar aquella cantidad del analito cuya señal sea similar o mayor a la de la muestra blanco en una proporción de 10 a 1, lo que corresponde a la cantidad asociada al límite de cuantificación.²⁴

Criterio de aceptación.²⁴

El LC debe ser menor a la especificidad del contenido de la prueba de impurezas.

j. Estabilidad analítica de la muestra.

La estabilidad analítica de la muestra es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.²⁴

Para determinar la estabilidad analítica de muestras independientes a partir de una muestra homogénea, el analista debe procesar simultáneamente por triplicado las muestras para cada condición de almacenaje. Proseguir el análisis de cada una de las preparaciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada.²⁴

Criterio de aceptación.²⁴

$l d l \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.

$l d l \leq 3\%$ para métodos espectrofotométricos.

$l d l \leq 5\%$ si es biológicos.

$l d l$ = Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial.

k. Robustez.

La robustez es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros normales de operación.²⁴

Se establecen aquellos factores instrumentales y no instrumentales relacionados al propio método que se consideren críticos. En cada condición de operación distinta, así como a la condición normal, analizar cada condición por lo menos por triplicado.²⁴

Criterio de aceptación.²⁴

$l d l \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.

$l d l \leq 3\%$ para métodos espectrofotométricos.

$l d l \leq 5\%$ si es biológicos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El control de calidad de los productos farmacéuticos tiene como uno de sus objetivos, garantizar su efectividad, uno de los parámetros importantes que contribuye a esta garantía dando a conocer si por lo menos se cuenta con la mínima cantidad de principio activo necesaria para producir un efecto terapéutico, es la valoración. Tras esta aseveración cada medicamento fabricado debe tener un método analítico que permita cuantificar el contenido del (los) principio(s) activo(s).

En los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza se desarrolló una formulación de una solución oral de Paracetamol y Clorhidrato de fenilefrina en una concentración de 100mg/mL y 2mg/mL respectivamente, para su valoración no existen métodos reportados en la FEUM 9 ed. o en la USP 30 ed. que puedan ser aplicados y aunque existen otros métodos no farmacopeicos como el Flow injection de Knochen²⁵, el de García²⁶, la determinación fluorométrica propuesta por Arancibia²⁷, o la determinación colorimétrica tras una hidrólisis como la propuesta por Chafetz²⁸, que auxiliarían en la cuantificación de dichos principios activos, tienen el inconveniente de utilizar la sofisticada técnica de la cromatografía de alta resolución de líquidos, así como reactivos y demás equipos con los cuales no se cuenta en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza. Por todo lo anteriormente mencionado es necesario desarrollar un método analítico que sea específico para cada uno de los fármacos involucrados en la formulación, además de comprobar que cumple con los diversos parámetros de validación sugeridos por la normatividad vigente, demostrando de esta manera la efectividad del mismo.

III. OBJETIVO.

Establecer un método analítico por espectrofotometría ultravioleta para cuantificar Paracetamol y Clorhidrato de fenilefrina en una solución oral, así como comprobar mediante la evaluación de los parámetros de desempeño que el método funciona adecuadamente.

IV. HIPÓTESIS.

El manejo adecuado de las propiedades físico-químicas del paracetamol y el Clorhidrato de fenilefrina permitirá el desarrollo de un método analítico por espectrofotometría UV, que cumpla con los parámetros de desempeño adecuados para cuantificar a dichos principios activos en una solución oral.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

A. Material.

Matraces volumétricos 1L
Matraces volumétricos 100 mL
Matraces volumétricos 50 mL
Matraces volumétricos 25 mL
Pipetas volumétricas 10 mL
Pipetas volumétricas 5 mL
Pipetas volumétricas 3 mL
Bureta de 10 mL
Matraz balón de 50 mL
Vasos de precipitado de 250 mL
Vasos de precipitado de 30 mL
Embudos de separación de 125 mL
Embudos de talle corto estriados de 5 cm
Soportes universal
Aros metálicos
Pinzas dobles de presión
Espátula
Piceta de 500mL
Celdas de cuarzo

B. Equipo.

Refrigerador Marca Kelvinator
Placa de agitación y calentamiento Marca Corning

C. Instrumento.

Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS
Balanza analítica Marca Ohaus Analytical Standard
Termómetro -20°C a 150°C

D. Sustancias de referencia

SR-44. Sustancia de referencia de Paracetamol, 99.88%

SR-28. Sustancia de referencia de Clorhidrato de fenilefrina, 99.4%.

E. Reactivos.

Alcohol etílico absoluto. Baker

Alcohol metílico. Merck

Acetato de etilo. Baker

Agua destilada

Nitrito de sodio (NaNO_2). Baker

F. Soluciones.

Solución de Ácido clorhídrico (HCl) 0.05N

Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N

Solución de Ácido clorhídrico (HCl) 2N

Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) 2N

G. Insumos

Solución oral de Paracetamol y Clorhidrato de fenilefrina preparada de la siguiente forma:

En un vaso de acero inoxidable se coloca el polietilenglicol 6000, se adiciona agua purificada y se agita hasta completa disolución, posteriormente se agrega etanol y propilenglicol, se mezcla hasta homogeneizar y se calienta la mezcla a $72\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$; lentamente se añade a esta mezcla el Paracetamol y el Clorhidrato de fenilefrina, hasta completa disolución.

En otro vaso de acero inoxidable se disuelve nipagin sódico junto con nipazol en propilenglicol y se adiciona a la mezcla anterior, la fructosa es disuelta en agua y mediante filtración es adicionada a la mezcla. Finalmente se agrega a la mezcla, metabisulfito de sodio y el sabor naranja en forma de solución acuosa, con lo cual se deja enfriar la solución y se lleva a volumen final. Ver tabla 4.

Tabla 4. Formulación de la solución oral de Paracetamol con Clorhidrato de fenilefrina.

Ingrediente	Contenido por cada 100 mL
Paracetamol	10 g
Clorhidrato de fenilefrina	200 mg
Propilenglicol	25 mL
Etanol	5 mL
Polietilenglicol 6000	25 mL
Metabisulfito	50 mg
Fructosa	15 g
Nipagin sódico	100 mg
Nipazol simple	15 mg
Sabor naranja	30 mg
Agua c.b.p.	100 mL

SALDIVAR (2010)

Placebo analítico preparado con todos los excipientes de la formulación.

Placebo adicionado con Paracetamol a una concentración de 100 mg/mL.

Placebo adicionado con Clorhidrato de fenilefrina a una concentración de 2 mg/mL.

Placebo adicionado con Paracetamol y Clorhidrato de fenilefrina a una concentración de 100 mg/mL y 2 mg/mL respectivamente.

H. Procedimiento.

1. Tomando como punto de partida los coeficientes de absorptividad del Paracetamol y Clorhidrato de fenilefrina en HCl 0.05N, NaOH 0.1N, Metanol y Etanol respectivamente, se comenzó preparando soluciones de concentraciones apropiadas para obtener los espectros ultravioleta con una absorbancia aproximada de 0.5 en la longitud de máxima absorbancia de dichos fármacos.

2. Se obtuvieron dos diluciones en HCl 0.05N con concentraciones de 8 µg/mL de Paracetamol y 48 µg/mL de Clorhidrato de fenilefrina a partir de una solución que simula el contenido de 100 mg de Paracetamol y 2 mg de Clorhidrato presentes por cada mL de la solución oral a analizar, observándose una interferencia del Paracetamol en la respuesta de la solución de 48 µg/mL, mas no así en la respuesta de Paracetamol a 8 µg/mL con respecto a la presencia de la fenilefrina.

3. Posteriormente se probaron varios métodos como el de la primera y segunda derivadas citadas por Owen ¹³, y Rouessac ¹⁶, como una alternativa para el traslape de compuestos inmersos en una misma matriz. O bien el método propuesto por Chafetz ²⁸, quien afirma que mediante una reacción en cadena de paracetamol con HCl, NaNO₂ e NaOH se produciría un compuesto colorido indicativo de estabilidad con respecto a la hidrólisis del Paracetamol.

4. Tras el resultado desfavorable de la especificidad de los métodos probados se optó por realizar pruebas de solubilidad de los dos principios activos en acetato de etilo y dicloroetano. Observando que el acetato de etilo solubiliza al Paracetamol pero no al Clorhidrato de fenilefrina se decidió establecer las condiciones para cuantificar a este último tras la extracción del Paracetamol y emplear las diluciones con HCl 0.05N de la solución oral para cuantificar al Paracetamol, de tal forma que se diseñaron dos métodos analíticos.

5. Con los métodos desarrollados, se llevó a cabo la evaluación de las pruebas de desempeño que comprenden:

5.1 Linealidad del sistema. A partir de una solución stock de 400 µg/mL de Clorhidrato de fenilefrina y otra de 625 µg/mL de Paracetamol se prepararon por triplicado las soluciones que se muestran en la tabla 5. Las muestras para Paracetamol fueron leídas a 244 nm utilizando HCl 0.05N como blanco, y las muestras de Clorhidrato de fenilefrina se leyeron a 273 nm empleando agua destilada como blanco.

Tabla 5. Niveles de concentración para cada fármaco en la linealidad del sistema.

Nivel	Concentración (µg/mL) de Paracetamol	Concentración (µg/mL) de Clorhidrato de fenilefrina
60%	4.5	28.8
80%	6.0	38.4
100%	7.5	48.0
120%	9.0	57.6
140%	10.5	67.2

5.2 Precisión de sistema. Se determinó por el análisis de seis muestras de una solución con sustancia de referencia correspondiente al 100% de la concentración del analito de interés (7.5 µg/mL para Paracetamol y 48 µg/mL de Clorhidrato de fenilefrina), preparadas por dilución de una solución stock.

5.3 Especificidad con respecto al placebo. Se preparó un placebo adicionado con Paracetamol a una concentración de 100 mg/mL y se sometió al método analítico para Clorhidrato de fenilefrina de igual manera se adicionó el placebo analítico con Clorhidrato de fenilefrina a una concentración 2 mg/mL y se empleó el método analítico para Paracetamol.

5.4 Especificidad con respecto a los productos de degradación. Como no se contaba con los productos de degradación de los principios activos se sometió al Paracetamol a condiciones de hidrólisis ácida (HCl 2N) y básica (NaOH 2N) para que los productos obtenidos se tratarán con el método analítico y se obtuvieran sus espectros UV. Se realizó la misma operación con el Clorhidrato de fenilefrina.

5.5 Linealidad del método. Para este parámetro se preparo un placebo adicionado con 100 mg de Paracetamol y 2 mg de Clorhidrato de fenilefrina por cada mL y se empleo el método analítico para cuantificar Paracetamol, por otra parte a un placebo de solución que contenía 100 mg de Paracetamol por mL se adiciono la cantidad necesaria de Clorhidrato de fenilefrina para obtener una concentración de 2 mg/mL y se utilizo el método analítico diseñado para este principio activo. Se obtuvieron tres muestras para cada nivel, con las concentraciones que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Niveles de concentración para cada fármaco en la linealidad del método.

Nivel	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de Paracetamol	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de Clorhidrato de fenilefrina
80%	6.0	38.4
100%	7.5	48.0
120%	9.0	57.6

5.6 Exactitud. A partir de un placebo adicionado con iguales concentraciones de los principios activos como en la solución oral, siguiendo el método analítico se prepararon seis muestras independientes a una concentración del 100% (7.5 $\mu\text{g/mL}$ para Paracetamol y 48 $\mu\text{g/mL}$ de Clorhidrato de fenilefrina) del analito de interés.

5.7 Reproducibilidad. Usando el método propuesto se analizó la solución oral de paracetamol y clorhidrato de fenilefrina que se desarrollo en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza, por dos analistas en dos días diferentes, realizando el análisis por triplicado en cada condición.

5.8 Estabilidad analítica de la muestra. Para determinar la estabilidad analítica de muestras independientes a partir de una muestra homogénea, se preparo un placebo adicionado con 100 mg de Paracetamol y 2 mg de Clorhidrato de fenilefrina por cada mL y empleando los respectivos métodos analíticos se procesaron simultáneamente por triplicado las muestras para almacenarlas a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) y refrigeración (2 °C a 8 °C), prosiguiendo con la lectura de cada una de las preparaciones a las 24 h y 48 h junto con un estándar preparado en el instante.

5.9 Robustez. Se considero como un parámetro de robustez la manera de tomar la muestra inicial, por lo que, siguiendo el método analítico descrito para Paracetamol se prepararon muestras por triplicado midiendo y pesando la muestra, además de enjuagar la pipeta como tercera opción de toma de muestra.

VI. RESULTADOS.

A. Métodos evaluados.

Tabla 7. Resultados en la respuesta de los diferentes métodos probados para el diseño del método analítico.

Métodos evaluados	Resultado en la respuesta
Espectros en HCl 0.05N NaOH 0.1N Metanol Etanol	Traslape de espectros de Paracetamol a 273 nm, longitud de máxima absorbancia del Clorhidrato de fenilefrina.
Primera derivada	Interferencia en las longitudes de onda de máxima absorbancia para ambos principios activos involucrados en la formulación.
Segunda derivada.	Interferencia en las longitudes de onda de máxima absorbancia para ambos principios activos involucrados en la formulación.
Método de Chafetz ²⁸ .	Absorbancia del producto colorido del Clorhidrato, que se obtiene después de las Rx en cadena que señala el método, en la misma región del espectro del producto colorido del Paracetamol.
Extracción Líquido-líquido.	Extracción favorable del Paracetamol a partir de una dilución de la solución oral, permitiendo la cuantificación selectiva del Clorhidrato de fenilefrina.

Los espectros ultravioleta de Clorhidrato de fenilefrina a 48 µg/mL en agua (figura 11) y de Paracetamol a 8 µg/mL en HCl 0.05N (figura 12) demuestran las longitudes de máxima absorbancia a las cuales se realizan las lecturas correspondientes para el análisis de cada fármaco.

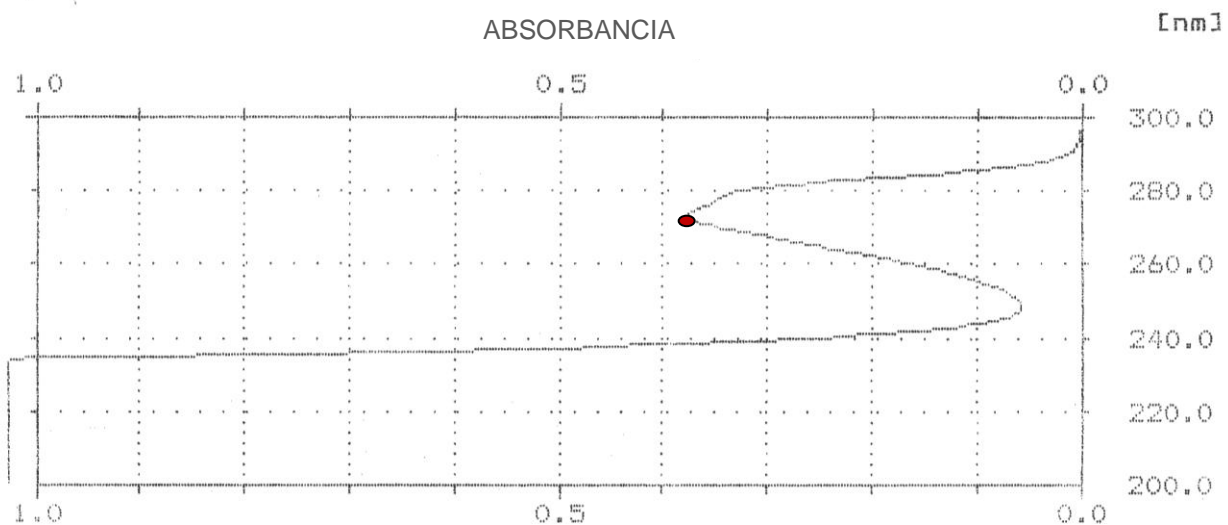


Figura 11. Espectro ultravioleta de Clorhidrato de fenilefrina a 48 $\mu\text{g/mL}$ en agua, con ● 273 nm como longitud de máxima absorbancia.

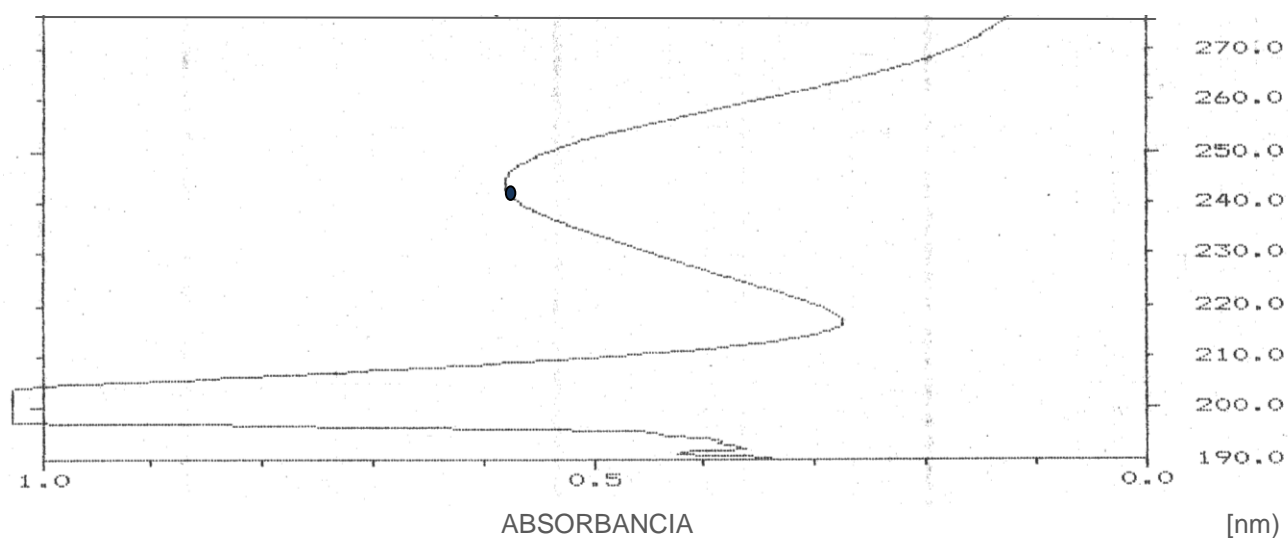


Figura 12. Espectro ultravioleta de Paracetamol a 8 $\mu\text{g/mL}$ en HCl 0.05N, con ● 244 nm como longitud de máxima absorbancia.

Después de ensayar con los métodos mencionados se decidió establecer un método analítico para Paracetamol y otro para Clorhidrato de fenilefrina, basados en los resultados de las diluciones con HCl 0.05N para el primer caso y en las extracciones con Acetato de etilo para el segundo.

B. Descripción de los métodos analíticos.

Método analítico para Clorhidrato de fenilefrina.

Preparación de la solución de referencia. Pesar con exactitud 25 mg de Sustancia de Referencia de Clorhidrato de fenilefrina y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, adicionar 15 mL de agua destilada agitar mecánicamente hasta completa disolución, llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Transferir 3 mL de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 25 mL, diluir a volumen con agua destilada y mezclar. Transferir 10 mL de esta solución a un embudo de separación con capacidad para 125 mL y realizar cuatro extracciones con 50 mL de Acetato de etilo durante 1 min cada una permitiendo que en cada extracción las fases se separen por un lapso de 3 min, desechar la fase orgánica y conservar la fase acuosa. Antes de la última extracción enjuagar el contenedor en el que se recibe la fase acuosa con 5 mL de agua destilada y depositarla en el embudo, realizar la extracción y recibir la fase acuosa en un matraz volumétrico de 25 mL, diluir a volumen con agua destilada. La disolución final contiene aproximadamente 48 µg/mL de Clorhidrato de fenilefrina.

Preparación de la muestra. Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL un volumen de solución oral medido con exactitud que sea equivalente a 6 mg de Clorhidrato de fenilefrina (3 mL de solución oral), diluir a volumen con agua destilada y mezclar. Transferir 10 mL de esta solución a un embudo de separación con capacidad para 125 mL y proceder a realizar las extracciones como se indica en la preparación de la solución de referencia. La solución final contiene aproximadamente 48 µg/mL de Clorhidrato de fenilefrina.

Determinar tanto la absorbancia de la solución de referencia como de las muestras a la longitud de onda de máxima absorbancia de 273 nm, utilizando agua destilada como blanco.

Calcular la cantidad de Clorhidrato de fenilefrina presente en la solución oral mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{A_m}{A_s} \times \frac{C_s}{V_m} \times 125 = \text{mg /mL de Clorhidrato de fenilefrina}$$

En donde

Am: Absorbancia de la muestra.

As: Absorbancia de la solución de referencia.

Cs: Concentración de la solución de referencia en mg/mL

Vm: Volumen de la muestra (solución oral) medido en mL.

125: Factor de dilución de la muestra.

Método analítico para Paracetamol.

Preparación de la solución de referencia. Pesar con exactitud 25 mg de Sustancia de Referencia de Paracetamol y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de HCl 0.05N agitar mecánicamente hasta completa disolución, llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Transferir 3 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con HCl 0.05N y mezclar. La solución final contiene aproximadamente 7.5 µg/mL de Paracetamol.

Preparación de la muestra. Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL un volumen de solución oral medido con exactitud equivalente a 500 mg de Paracetamol (5mL de solución), diluir a volumen con HCl 0.05N y mezclar. Transferir 5mL de esta solución a un segundo matraz de 100 mL, diluir a volumen y mezclar. Finalmente transferir 3 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL diluir a volumen con HCl 0.05N y mezclar. La solución final contiene aproximadamente 7.5 µg/mL de Paracetamol.

Determinar la absorbancia de la solución de referencia y las muestras a la longitud de onda de máxima absorbancia de 244 nm ajustando el espectrofotómetro con HCl 0.05N como blanco.

Calcular la cantidad de paracetamol en la solución mediante la siguiente Fórmula.

$$\frac{A_m}{A_s} \times \frac{C_s}{V_m} \times \frac{1000000}{15} = \text{mg /mL de Paracetamol}$$

En donde

A_m: Absorbancia de la muestra.

A_s: Absorbancia de la solución de referencia.

C_s: Concentración de la solución de referencia en mg/mL

V_m: Volumen de la muestra (solución oral) en mL.

$\frac{1000000}{15}$: Factor de dilución de la muestra.

C. Pruebas de desempeño para Clorhidrato de fenilefrina.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Tabla 8. Absorbancias del Clorhidrato de fenilefrina en los cinco niveles de concentración de la linealidad del sistema

Nivel	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Respuesta Absorbancia
60%	28.8	0.268
		0.269
		0.264
80%	38.4	0.357
		0.354
		0.359
100%	48.0	0.445
		0.447
		0.446
120%	57.6	0.512
		0.528
		0.536
140%	67.2	0.611
		0.623
		0.615

$$r^2 = 0.99$$

$IC_{\text{pendiente}} = \text{de } 8.8 \times 10^{-3} \text{ a } 9.29 \times 10^{-3} \text{ no incluye al } 0$

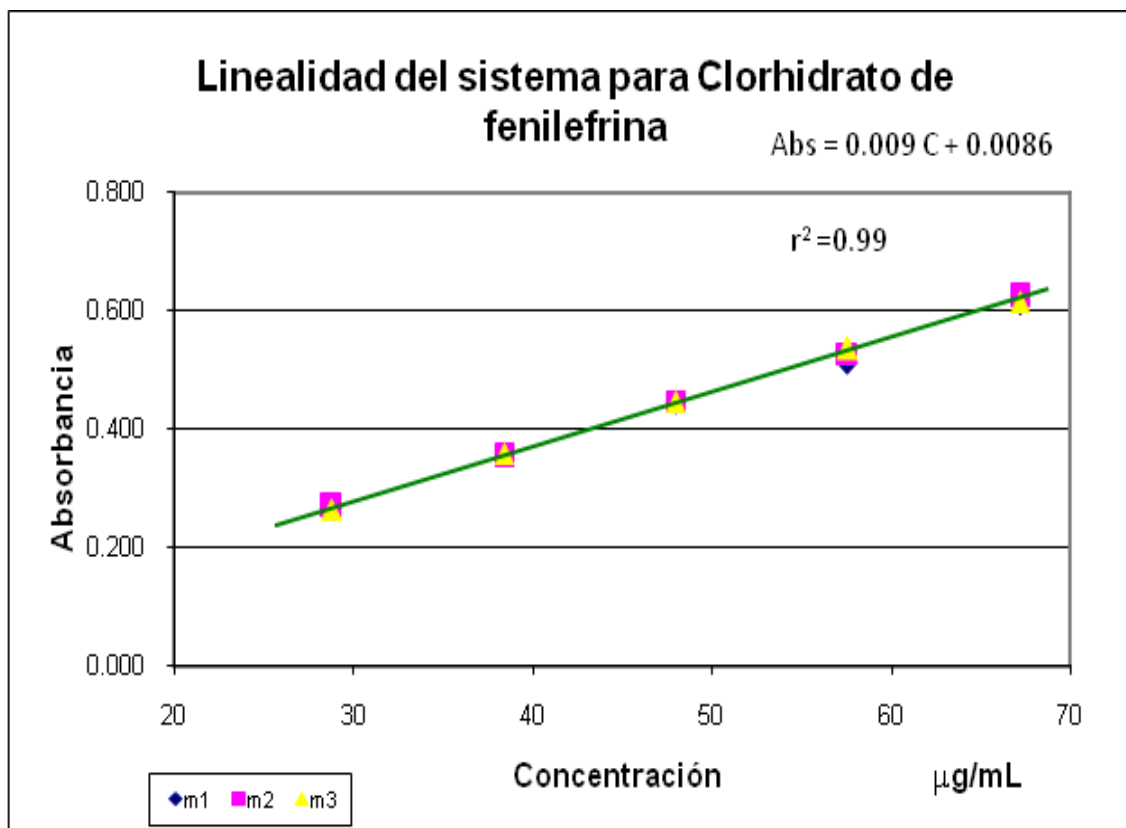


Figura 13. Grafica de la linealidad del sistema para Clorhidrato de fenilefrina, con cinco niveles de concentración con tres replicas por nivel.

2. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Tabla 9. Absorbancia de las seis muestras de Clorhidrato de fenilefrina en la precisión del sistema.

No. de muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Respuesta Absorbancia
1	48.0	0.448
2	48.0	0.441
3	48.0	0.440
4	48.0	0.445
5	48.0	0.447
6	48.0	0.446

CV = 0.67%

3. ESPECIFICIDAD.

Tabla 10. Especificidad del método analítico que cuantifica Clorhidrato de fenilefrina.

Sustancias relacionadas	Especificidad para Clorhidrato de fenilefrina
Placebo analítico	Especifico
Productos de degradación ácida	Especifico
Productos de degradación básica	No especifico
Ver Anexo I	

4. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Tabla 11. Cantidad adicionada, recuperada y porcentaje de recobro en los tres niveles para determinar la linealidad del método.

Nivel	Cantidad Adicionada µg/mL	Cantidad Recuperada µg/mL	% Recuperado
80%	38.900	39.76	102.2
		39.88	102.5
		38.17	98.50
100%	48.624	48.23	99.20
		49.21	101.2
		48.96	100.7
120%	58.350	57.68	98.80
		59.15	101.4
		58.17	99.70

$r^2 = 0.99$
IC pendiente de 0.90 a 1.06
IC ordenada de -2.30 a 4.59
CV_{y/x} = 1.44%

%R_{promedio} = 100.43%
IC_{%R} de 99.24% a 101.62%
CV_{%R} = 1.53 %

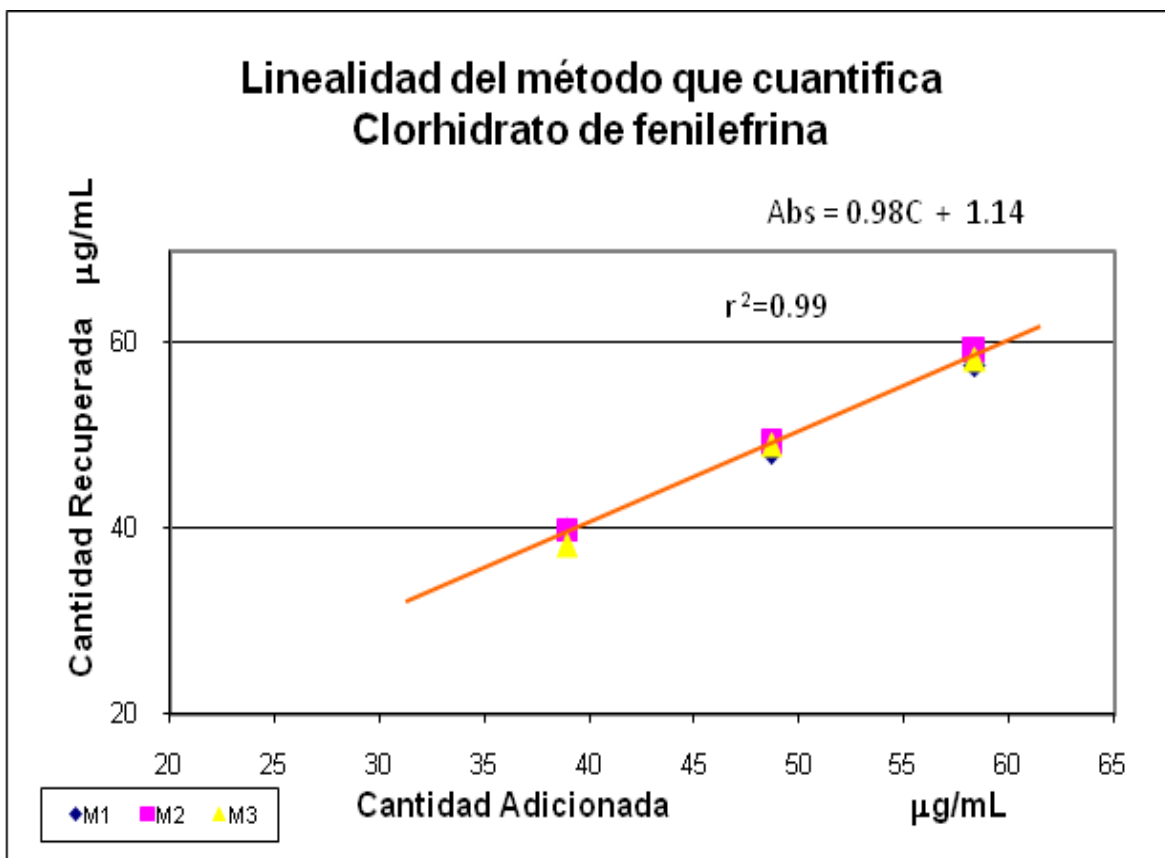


Figura 14. Grafica de la linealidad del método de Clorhidrato de fenilefrina con tres niveles de concentración y tres replicas por nivel

5. EXACTITUD.

Tabla 12. Porcentajes de recobro en la exactitud del método.

No. de muestra	Cantidad Adicionada $\mu\text{g/mL}$	Cantidad Recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recuperado
1	48.62	47.94	98.59
2	48.62	49.89	102.61
3	48.62	48.91	100.60
4	48.62	48.67	100.09
5	48.62	49.65	102.11
6	48.62	50.01	102.85

IC_{%R} de 99.39% a 102.89%

%R_{promedio} = 101.14%

CV_{%R} = 1.65 %

6. REPRODUCIBILIDAD.

Tabla 13. Resultado de la reproducibilidad del método analítico.

	Respuesta % de contenido	
	Día 1	Día 2
Analista 1	105.48%	101.83%
	101.52%	99.35%
	101.77%	101.33%
Analista 2	102.23%	99.50%
	102.48%	100.50%
	102.98%	100.25%

CV = 2.05%

7. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LAS MUESTRAS.

Tabla 14. Contenido en % de la fenilefrina después de las 24 h de almacenar las muestras en temperatura ambiente.

Tiempo de almacenaje a temperatura ambiente (15°C a 30°C).		
Muestra	Inicial	24 h
1	105.48%	107.82%
2	101.52%	106.03%
3	101.77%	106.28%
Promedio	102.93%	106.71%
CV	2.15%	0.91%

$$|d| = 3.79$$

Tabla 15. Contenido en % de la fenilefrina después de las 24 h de almacenar las muestras en refrigeración.

Tiempo de almacenaje en refrigeración (2°C a 8°C).		
Muestra	Inicial	24 h
1	101.68%	101.49%
2	102.45%	99.46%
3	101.93%	100.22%
Promedio	102.02%	100.39%
CV	0.38%	1.02%

| d | = 1.63

D. Pruebas de desempeño de Paracetamol.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla 16. Absorbancias del Paracetamol en los cinco niveles de concentración de la linealidad del sistema

Nivel	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Respuesta Absorbancia
60%	4.5	0.303
		0.299
		0.300
80%	6.0	0.398
		0.401
		0.397
100%	7.5	0.493
		0.498
		0.493
120%	9.0	0.604
		0.591
		0.591
140%	10.5	0.683
		0.686
		0.688

$$r^2 = 0.99$$

IC_{pendiente} de 0.063 a 0.065

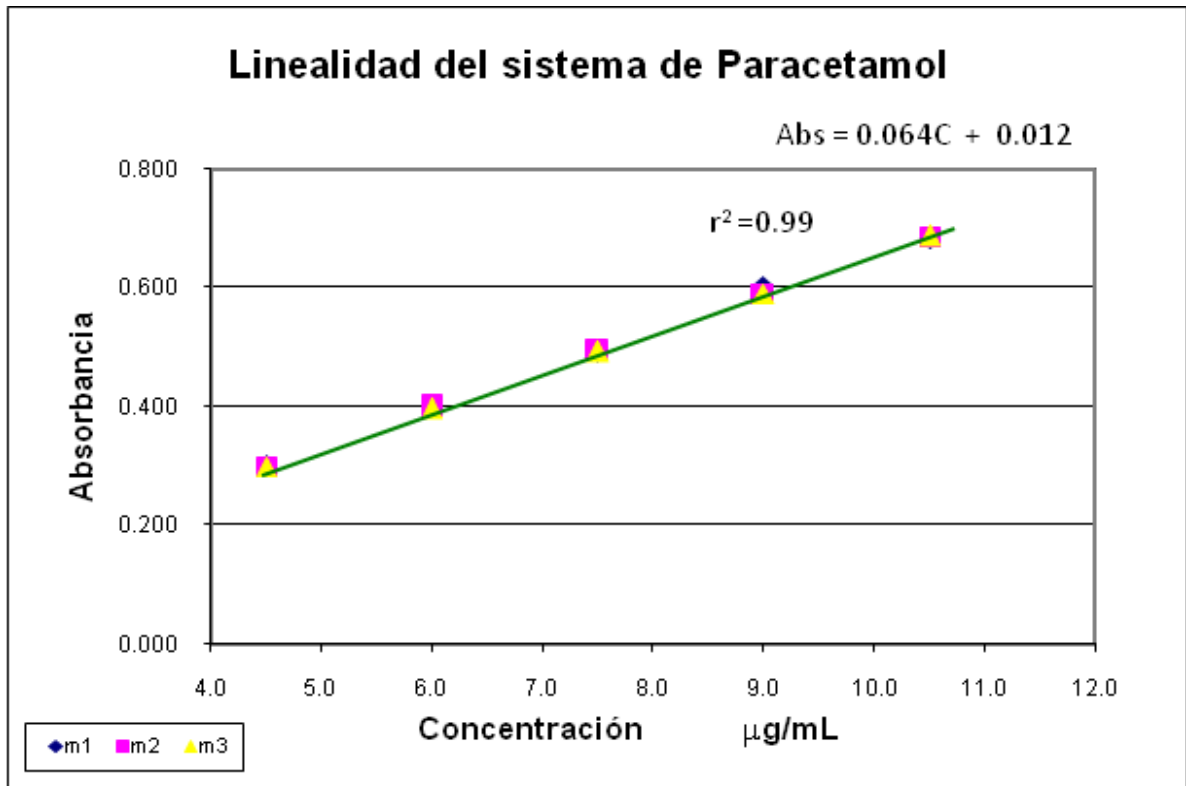


Figura 15. Grafica de la linealidad del sistema de Paracetamol, con cinco niveles de concentración con tres replicas por nivel.

2. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Tabla 17. Absorbancia de las seis muestras de Paracetamol en la precisión del sistema

Concentración µg/mL	Respuesta Absorbancia
7.5	0.493
7.5	0.498
7.5	0.493
7.5	0.495
7.5	0.494
7.5	0.505

CV = 0.85%

3. ESPECIFICIDAD.

Tabla 18. Especificidad del método analítico que cuantifica Paracetamol.

Sustancias relacionadas	Especificidad para el Paracetamol
Placebo analítico	Especifico
Productos de degradación ácida	Especifico
Productos de degradación básica	No especifico

4. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Tabla 19. Cantidad adicionada, cantidad recuperada y porcentaje de recobro en los tres niveles para determinar la linealidad del método.

Nivel	Cantidad Adicionada µg/mL	Cantidad Recuperada µg/mL	% Recuperado
80%	6.0	5.92	98.70
		5.89	98.20
		5.97	99.50
100%	7.5	7.40	98.70
		7.31	97.50
		7.40	98.70
120%	9.0	9.03	100.40
		9.05	100.50
		9.11	101.20

$$r^2 = 0.99$$

IC pendiente de 0.99 a 1.10

IC ordenada de -0.77 a 5.59×10^{-3}

CV_{y/x} = 1.07%

%R promedio = 99.27%

IC %R de 98.32% a 100.22%

CV_{%R} = 1.24 %

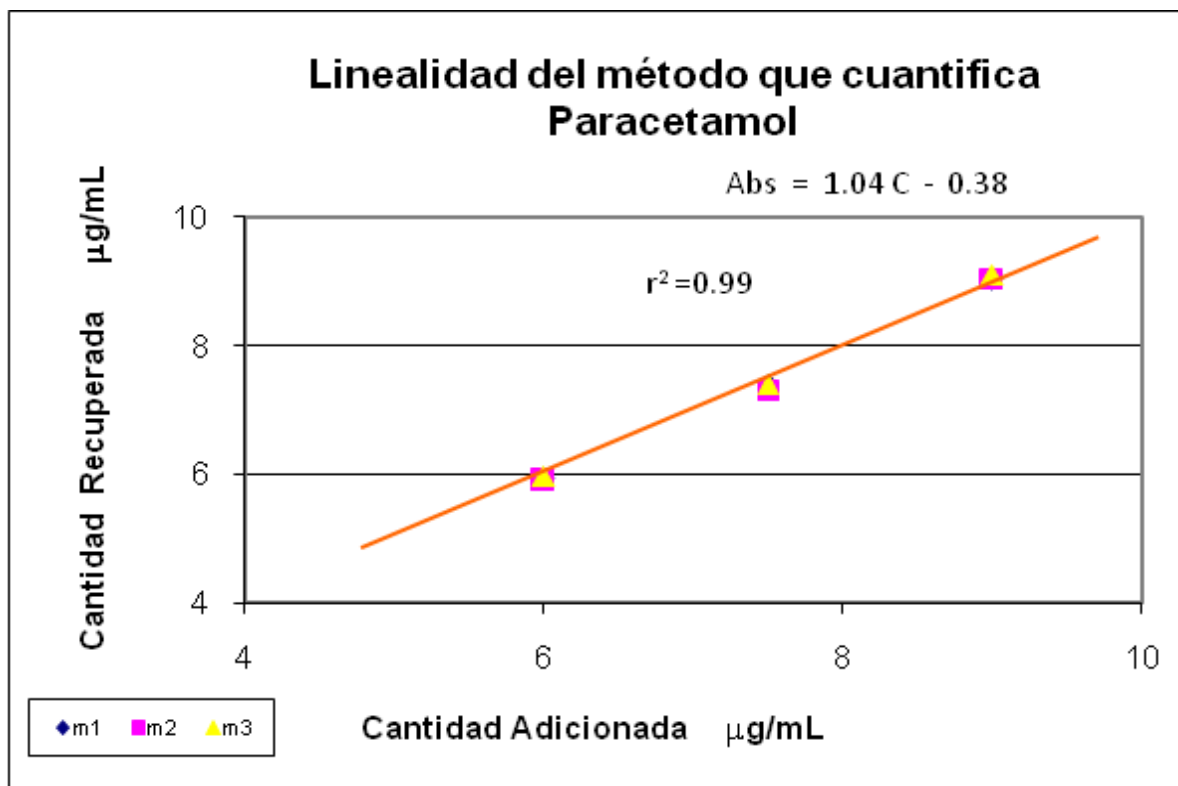


Figura 16. Grafica de la linealidad del método para Paracetamol, con tres niveles de concentración y tres replicas por nivel

5. EXACTITUD.

Tabla 20. Porcentajes de recobro en la exactitud del método.

Cantidad Adicionada $\mu\text{g/mL}$	Cantidad Recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recuperado
7.52	7.35	97.69%
7.52	7.52	99.98%
7.52	7.52	99.98%
7.52	7.44	98.94%
7.52	7.44	98.94%
7.52	7.30	97.07%

IC_{%R} de 97.52% a 100.02%

%R_{promedio} = 98.77%

CV %R = 1.20 %

6. REPRODUCIBILIDAD.

Tabla 21. Resultado de la reproducibilidad del método analítico.

	Respuesta % de contenido	
	Día 1	Día 2
Analista 1	93.71%	95.03%
	94.94%	94.40%
	93.30%	93.36%
Analista 2	96.35%	93.40%
	94.27%	94.82%
	94.89%	95.63%

CV = 1.01%

7. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Tabla 22. Contenido en % del Paracetamol después de almacenar las muestras a temperatura ambiente.

Tiempo de almacenaje a temperatura ambiente (15°C a 30°C).			
Muestra	Inicio	24 h	48 h
1	97.81%	101.46%	100.53%
2	100.11%	102.49%	100.74%
3	100.11%	102.49%	101.35%
Promedio	99.22%	101.96%	100.75%
CV	1.33%	0.54%	0.42%

| d |_{24h} = 2.73

| d |_{48h} = 1.53

Tabla 23. Contenido en % del Paracetamol después de almacenar las muestras en refrigeración.

Tiempo de almacenaje en refrigeración (2°C a 8°C).			
muestra	Inicio	24 h	48 h
1	98.94%	100.92%	99.59%
2	98.94%	102.16%	100.82%
3	97.07%	100.10%	98.57%
Promedio	98.32%	101.06%	99.66%
CV	1.10%	1.03%	1.13%

| d |_{24h} = 2.74

| d |_{48h} = 1.34

8. ROBUSTEZ.

Tabla 24. Rendimientos en la cuantificación de la solución oral por condición analizada.

No. de muestra	Condiciones de robustez		
	Normal	Pesar	Enjuagar
1	98.63%	97.61%	100.26%
2	97.41%	99.65%	101.28%
3	99.65%	98.84%	101.69%
Promedio	98.56%	98.70%	101.08%
CV	1.14%	1.04%	0.73%

| d |_{pesar} = 0.14

| d |_{enjuagar} = 2.51

Tabla 25. Resumen de resultados de las pruebas de desempeño para los métodos analíticos desarrollados.

Parámetro	Criterio	Método de Clorhidrato de fenilefrina	Método de Paracetamol
Linealidad del sistema.	$r^2 \geq 0.98$ IC _m no incluye al 0	$r^2 = 0.99$ IC _m de 8.8×10^{-3} a 9.29×10^{-3} no incluye al 0	$r^2 = 0.99$ IC _m de 0.063 a 0.065 no incluye el 0
Precisión del sistema.	CV $\leq 1.5\%$	CV = 0.67%	CV = 0.85%
Linealidad del método.	$r^2 \geq 0.98$ IC _m incluye al 1 IC _b . Incluye al 0 CV _{y/x} $\leq 3\%$	$r^2 = 0.99$ IC _m de 0.90 a 1.06 IC _b de -2.30 a 4.59 CV _{y/x} = 1.44%	$r^2 = 0.99$ IC _m de 0.99 a 1.10 IC _b de -0.77 a 5.59×10^{-3} CV _{y/x} = 1.07%
	IC _{%R} incluye al 100% %R _{prom} entre 97-103% CV _{%R} $\leq 3\%$	IC _{%R} de 99.24% a 101.62% %R _{promedio} = 100.43% CV _{%R} = 1.53 %	IC _{%R} de 98.32% a 100.22% %R _{promedio} = 99.27% CV _{%R} = 1.24%
Exactitud.	IC _{%R} incluye al 100% %R _{prom} entre 97-103% CV _{%R} $\leq 3\%$	IC _{%R} de 99.39% a 102.89% %R _{promedio} = 101.14% CV _{%R} = 1.65 %	IC _{%R} de 97.52% a 100.02% %R _{promedio} = 98.77% CV _{%R} = 1.20 %
Reproducibilidad.	CV $\leq 3\%$	CV = 2.05%	CV = 1.01%
Estabilidad.	$ d \leq 3\%$	24 h TA 3.79 TR 1.63	24 h 48 h TA 2.73 1.53 TR 2.74 1.34
Robustez.	$ d \leq 3\%$	NR	Pesar 0.14 Enjuagar 2.51

NR: No se realizo.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se observa que aunque algunos disolventes desplazan las longitudes de máxima absorbancia de algunas sustancias, ya sea a longitudes de onda mas cortas o largas Connors¹¹, Clarkes⁴, no fue posible obtener espectros de Clorhidrato de fenilefrina y Paracetamol en HCl 0.05N, NaOH 0.1N, etanol y metanol, que no se traslapan e interfirieran en la longitud de máxima absorbancia de cada principio activo.

Realizando diluciones con HCl 0.05N a una solución que tuviera la concentración de 100 mg de Paracetamol y 2 mg de Clorhidrato de fenilefrina por mililitro, se obtuvo una absorbancia a 244 nm debida únicamente a la presencia del Paracetamol, ya que al realizar la misma operación con Clorhidrato de fenilefrina a 2 mg/mL esta no genera ninguna absorbancia que pudiera adicionarse.

En cuanto se refiere al método propuesto por Chafetz²⁸ como indicativo de la estabilidad para la hidrólisis de Paracetamol, no aplica para la especificidad entre los fármacos. Esto se debe a la similitud estructural con respecto al grupo fenólico de la fenilefrina que también posee el Paracetamol y que hace competitiva la reacción en cadena a la cual se somete la muestra, produciendo dos compuestos coloridos que absorben en la misma región del espectro visible.

El uso de las derivadas espectrales se justifica para el aumento en la resolución de la respuesta y como alternativa en mezclas o muestras con mas de un componente que absorba en la misma región Owen¹³ fenómeno que no se aprecio en la primera y segunda derivada de la solución prueba de los principios activos, puesto que considerando la distancia entre los mínimos y los máximos de las derivadas como proporcionales a la concentración del analito, estas mostraron una aditividad en las respuestas hecho que genera la interferencia del Paracetamol sobre la respuesta del Clorhidrato de fenilefrina.

La extracción Líquido-Líquido de una sustancia inmersa en un disolvente, por acción de su solubilidad en dos fases inmiscibles Mohrig¹⁷ es el principio de la extracción del paracetamol con acetato de etilo a partir de una dilución 3/50 de la solución oral. Al tener el Paracetamol una mayor solubilidad en acetato de etilo que en agua, caso contrario al del Clorhidrato de fenilefrina, se encontró la manera de aislar al Paracetamol de la muestra, permitiendo una respuesta del Clorhidrato en una solución acuosa que únicamente se debiera a él.

El proceso de extracción involucra posibles perdidas debidas a la formación de emulsiones entre los disolventes, tiempos de agitación y de separación de fases. El proceso se optimizo estableciendo las condiciones de tiempos para manipular las muestras y la solución de referencia.

Las absorbancias independientes de los principios activos en dos fases diferentes tras una extracción (paracetamol en acetato de etilo, clorhidrato de fenilefrina en agua) cumple con la especificidad en la respuesta analítica del método, sin embargo el uso de mayor cantidad de acetato de etilo para la dilución de paracetamol hasta 7.5 µg/mL elevaría el costo del método. Considerando como lo mas viable la extracción del Paracetamol para el análisis del Clorhidrato de fenilefrina y la dilución en HCl 0.05N de la solución oral para cuantificar Paracetamol, se determinó desarrollar dos métodos analíticos, es decir, un método para cada fármaco.

Si bien los métodos propuestos ya habían demostrado su selectividad con respecto a la presencia del principio activo concomitante revelando su especificidad como métodos de cuantificación; su empleo en muestras de hidrólisis básica para cada fármaco no conduce a una respuesta únicamente debida al fármaco en cuestión, ya que los productos de degradación tanto del clorhidrato de fenilefrina como del Paracetamol generan una respuesta a los 273 y 244 nm respectivamente, impidiendo que cada método sea indicativo de estabilidad.

Los parámetros de validación evaluados para los métodos desarrollados dieron resultados positivos para demostrar su adecuado funcionamiento; la linealidad del sistema y la precisión del sistema dejan ver que hay una congruencia entre las respuestas y la concentración así como la repetitibilidad entre las respuestas. El obtener métodos analíticos lineales permite realizar análisis en un rango del 80% al 120% del contenido de los fármacos, por otra parte la confirmación de una reproducibilidad y exactitud hacen al método confiable para su empleo por cualquier analista teniendo la certeza de que los resultados obtenidos serán veraces.

La robustez fue un parámetro en el cual se evaluó la forma en como se toma la muestra y el efecto que tiene sobre el método que cuantifica Paracetamol, si bien no es un parámetro crítico, se tomo en cuenta porque en algunos métodos analíticos se recomienda pesar o medir la muestra, o bien enjuagar la pipeta con la que se mide dicha muestra. Aunque esta prueba no se llevo a cabo como tal para el Clorhidrato de fenilefrina, durante el desarrollo del método se estableció que el tiempo de agitación y separación, así como la cantidad de acetato de etilo, son puntos críticos que de ser modificados alterarían de manera significativa el resultado de la cuantificación de Clorhidrato de fenilefrina.

La estabilidad analítica de las muestras para Paracetamol dan la alternativa de poder realizar la lectura de dichas muestras hasta las 48 h posteriores a su preparación, siempre y cuando se conserven a temperatura ambiente o en refrigeración; mientras que las muestras de fenilefrina únicamente se podrán analizar a las 24 h de su preparación, bajo condiciones de refrigeración, o las respuestas obtenidas no serían confiables.

VIII. CONCLUSIÓN.

La semejanza entre las estructuras moleculares del Paracetamol y el Clorhidrato de fenilefrina generan espectros ultravioleta muy parecidos que se traslapan, propiciando el desarrollo de dos métodos analíticos los cuales cumplen con las características de validación para cuantificar Paracetamol y Clorhidrato de fenilefrina en una solución de 100 mg/mL y 2 mg/mL respectivamente. Estos métodos son aplicables para el control de calidad del producto a granel y producto terminado, ya que no demostraron ser indicativos de estabilidad durante su desarrollo.

Durante el desarrollo de los métodos analíticos la primer prueba de desempeño evaluada fue la Especificidad, debido a que las técnicas analíticas realizadas se llevaron a cabo sobre los principios activos involucrados, de tal forma que se detectará una respuesta únicamente debida a los fármacos.

La evaluación de los parámetros de desempeño para el método analítico que cuantifica Paracetamol, así como para el que cuantifica Clorhidrato de fenilefrina, demuestran que sus respuestas son confiables en un intervalo del 80% al 120% de la concentración del contenido aún 48 h después de haber preparado las muestras para el caso de Paracetamol y 24 h en refrigeración para el Clorhidrato de fenilefrina. Además ambos métodos demostraron ser exactos y reproducibles.

IX. SUGERENCIAS.

- Debido a que los métodos desarrollados no son indicativos de estabilidad se recomienda separar los productos de degradación para cuantificarlos, y mediante una relación estequiométrica conocer el contenido real de los principios activos.
- A consecuencia de la inestabilidad de las muestras analíticas de Clorhidrato de fenilefrina a las 24 h almacenadas a temperatura ambiente se sugiere realizar este estudio a las 6, 12 y 18 horas posteriores a su preparación, o almacenar las muestras a una temperatura entre 2 y 8 °C para leerlas a no más de 24 h después de su preparación.
- Como una medida precautoria en el empleo del método que cuantifica Clorhidrato de fenilefrina es de suma importancia respetar los tiempos señalados para la agitación del embudo de extracción y el de separación de los disolventes involucrados, así como los volúmenes de acetato de etilo establecidos para la extracción del Paracetamol.

X. ANEXOS.

Anexo1. Espectros del Clorhidrato de fenilefrina empleados en la especificidad del método con respecto al placebo y a los productos de degradación.

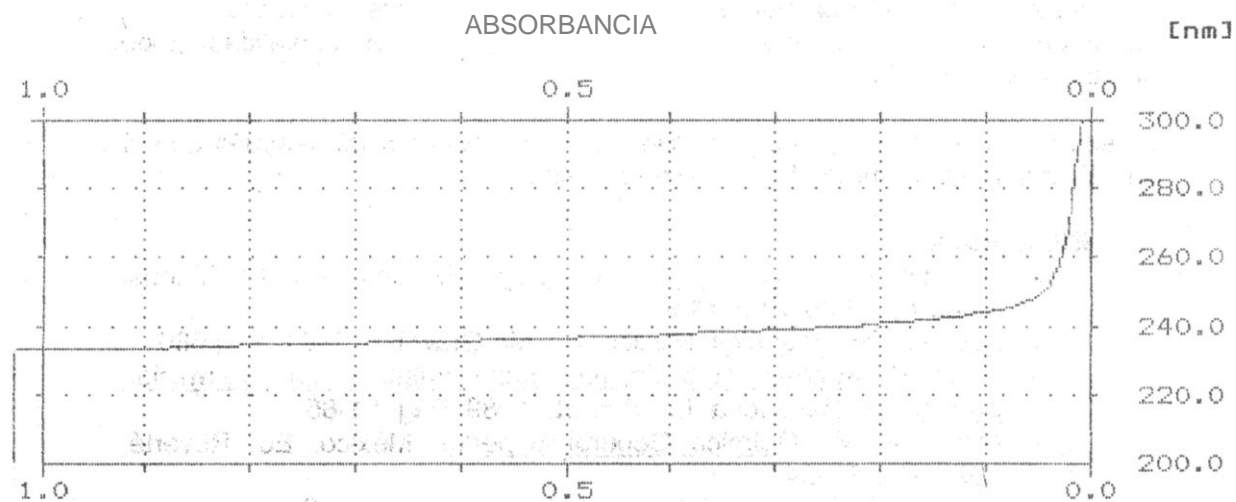


Figura 17. Espectro que muestra la ausencia de interferencias por Paracetamol a los 273 nm, después de aplicar el método analítico a un placebo cargado con Paracetamol.

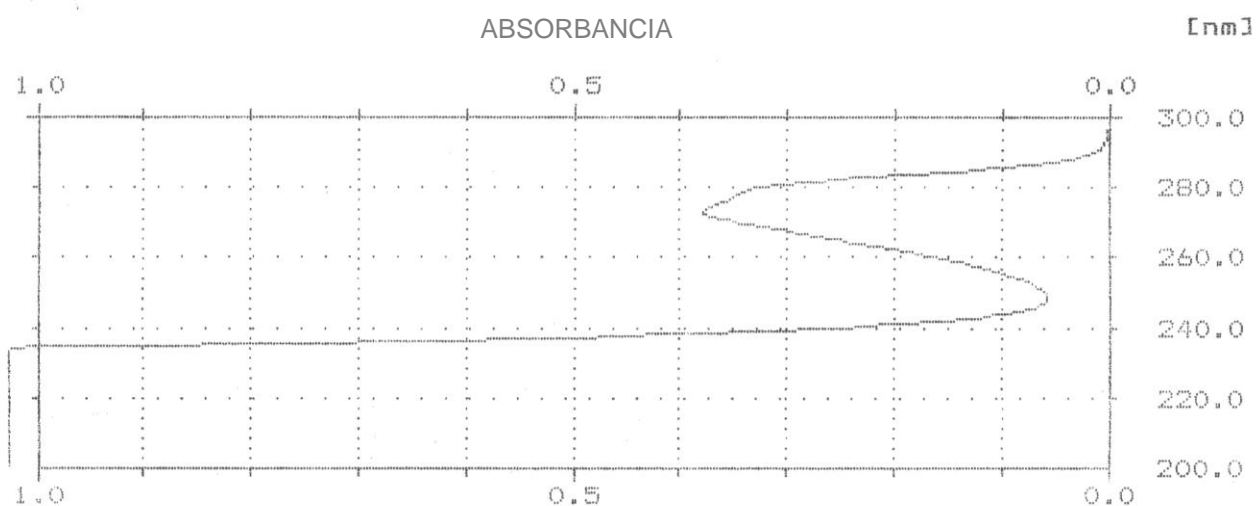


Figura 18. Espectro ultravioleta de Clorhidrato de fenilefrina a 48 µg/mL en agua, a 273 nm como longitud de máxima absorbancia.

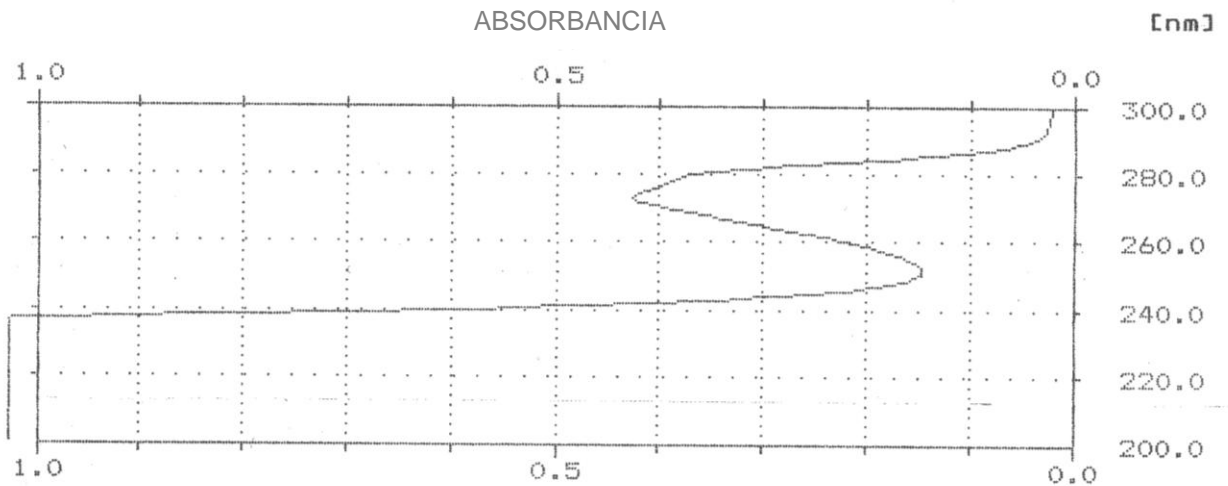


Figura 19. Espectro de una muestra del Clorhidrato de fenilefrina después de una reacción de hidrólisis ácida y del tratamiento con su respectivo método analítico, en el que se observa que no se degradó la molécula.

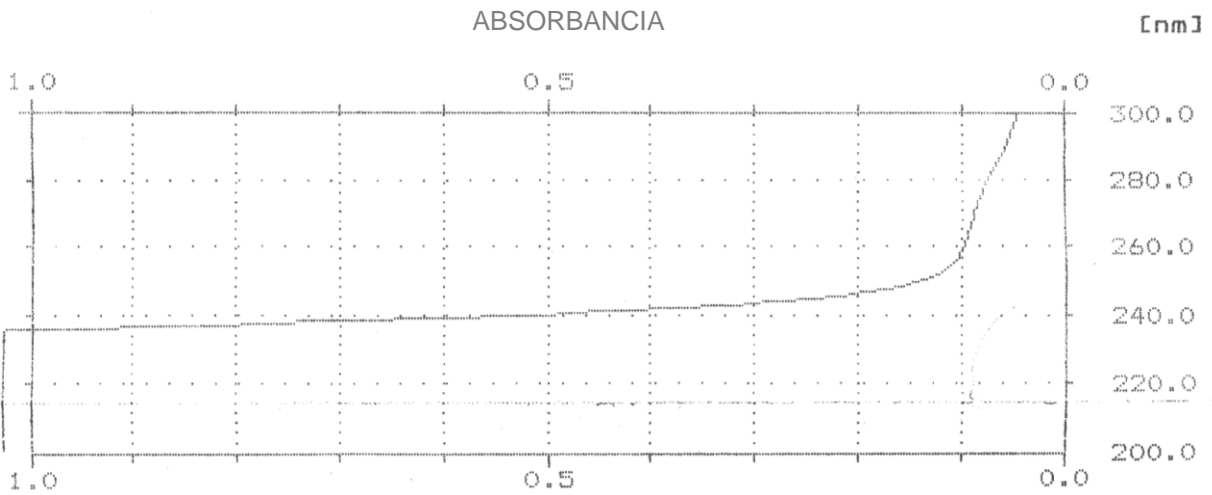


Figura 20. Espectro de una muestra de la hidrólisis básica de Clorhidrato de fenilefrina después de tratarla como indica el método analítico, en el que se observa una absorbancia a 273 nm.

Anexo 2. Espectros del Paracetamol empleados en la especificidad del método con respecto al placebo y a los productos de degradación.

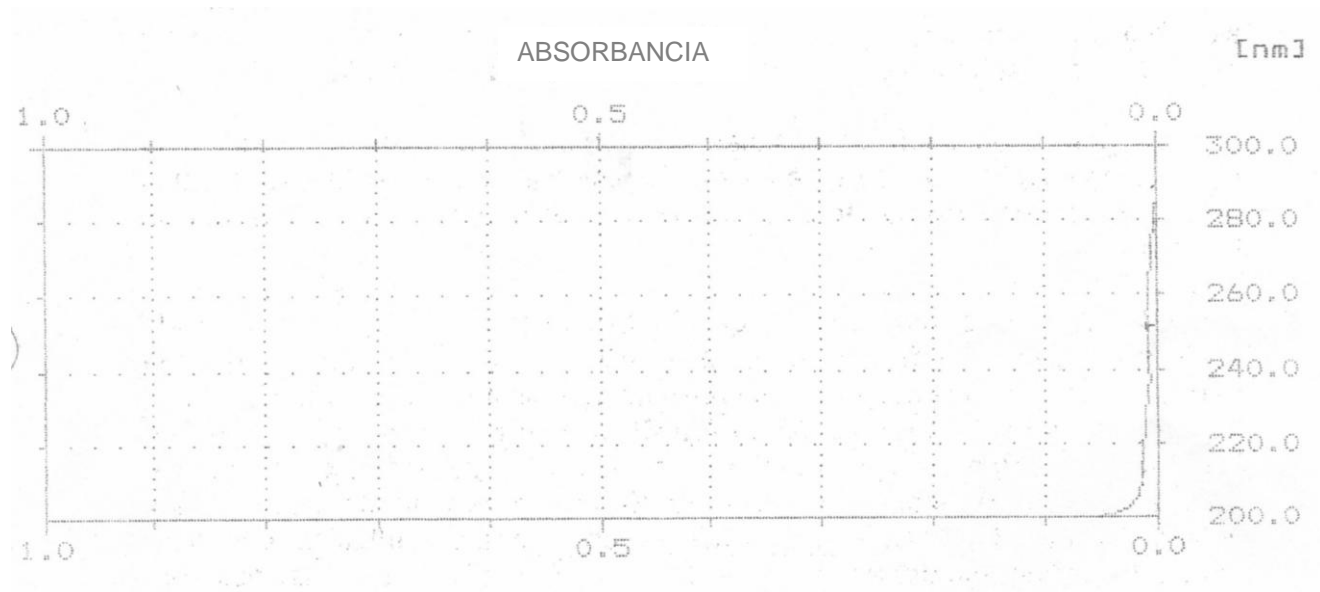


Figura 21. Espectro uv que muestra la ausencia de respuesta a 244 nm, después de aplicar el método analítico a una muestra de placebo cargado con Clorhidrato de fenilefrina.

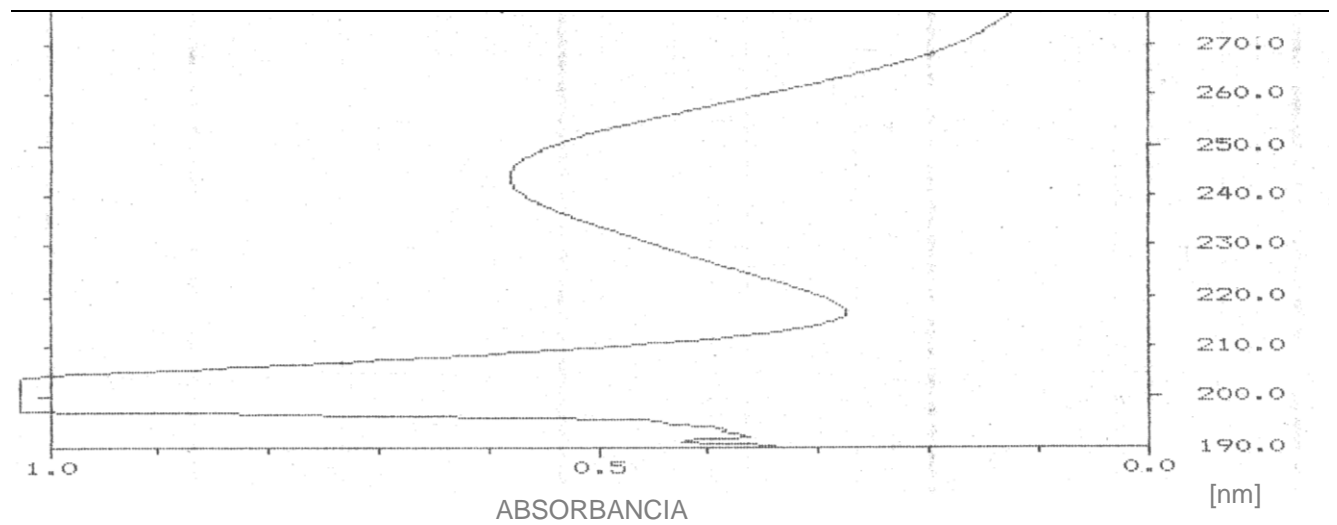


Figura 22. Espectro ultravioleta de Paracetamol a 8 µg/mL en HCl 0.05N, con 244 nm como longitud de máxima absorbancia.

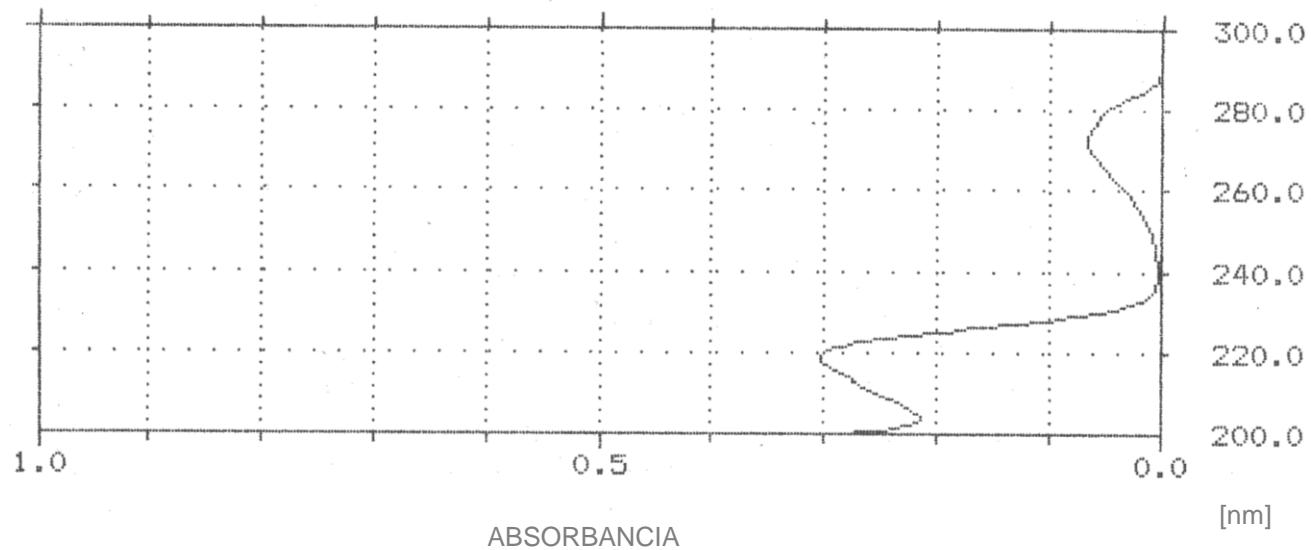


Figura 23. Espectro de una muestra de la hidrólisis ácida de Paracetamol, después de tratarla como indica el método analítico, en el que se observa una ausencia de absorbancia a 244 nm, longitud a la cual se cuantifica el Paracetamol.

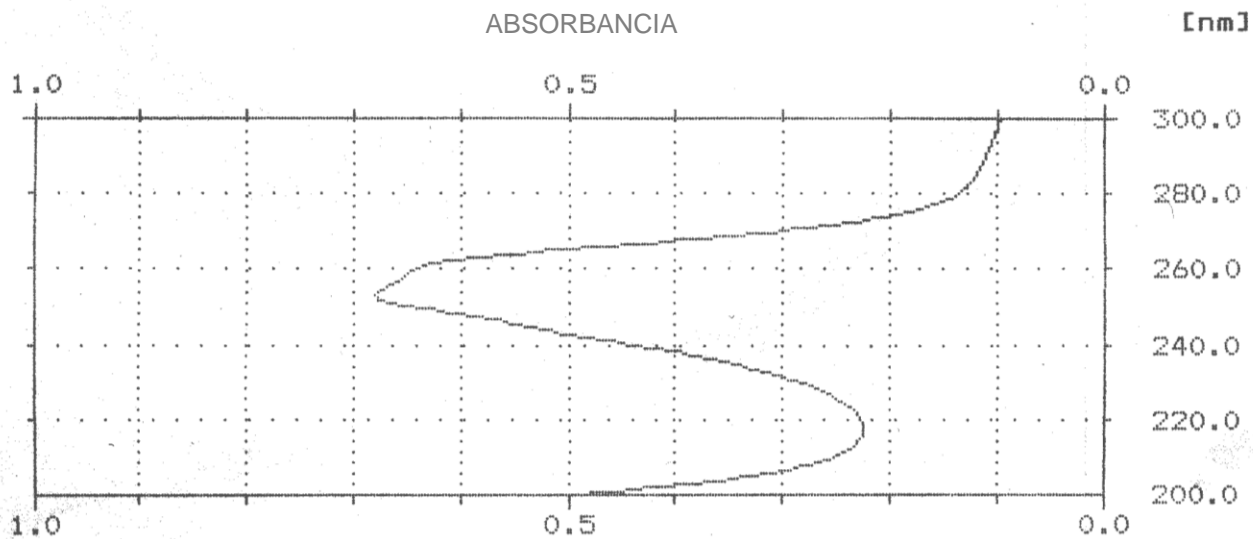


Figura 24. Espectro de una muestra de la hidrólisis básica de Paracetamol, después de tratarla como indica el método analítico. Se observa un aumento en la respuesta a 244 nm, lo cual se debe al producto generado.

Anexo 3. Fórmulas para la linealidad del sistema.

Pendiente

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

n = número de mediciones

Ordenada al origen

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de Confianza para la Pendiente.

$$IC_m = m \pm t_{0,975, n-2} S_m$$

$$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$$

Anexo 4. Fórmulas para la precisión del sistema

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

$$S = \sqrt{\frac{n (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n (n - 1)}}$$

Coefficiente de variación.

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

Anexo 5. Fórmulas para la linealidad del método.

Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.

Pendiente

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

n = número de mediciones

Ordenada al origen

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de Confianza para la Pendiente.

$$IC_m = m \pm t_{0,975 \ n-2} S_m$$

$$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - m \Sigma xy - b \Sigma y}{n - 2}}$$

Intervalo de Confianza para la ordenada al origen

$$IC_b = b \pm t_{0.975, n-2} S_b$$

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

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$$

Coefficiente de variación de regresión.

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$$

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

PORCENTAJE DE RECOBRO.

Media aritmetica

$$\bar{\%R} = \frac{\Sigma \%R}{n}$$

Desviación estándar.

$$S_{\%R} = \sqrt{\frac{n (\Sigma \%R^2) - (\Sigma \%R)^2}{n (n - 1)}}$$

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{\%R}} * 100$$

Intervalo de Confianza para la media poblacional.

$$IC_{\%R} = \bar{\%R} \pm t_{0.975n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Anexo 6. Fórmulas para la exactitud del método.

$$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

Media aritmética

$$\bar{\%R} = \frac{\Sigma \%R}{n}$$

Desviación estándar.

$$S_{\%R} = \sqrt{\frac{n(\Sigma \%R^2) - (\Sigma \%R)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{\%R}} * 100$$

Intervalo de Confianza para la media poblacional.

$$IC_{\%R} = \bar{\%R} \pm t_{0.975n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

n = número de recobros

Anexo 7. Fórmulas para la precisión del método.

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

$$S = \sqrt{\frac{n (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n (n - 1)}}$$

Coefficiente de variación.

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

Anexo 8. Fórmulas para la Estabilidad analítica de la muestra.

Media aritmética del análisis inicial.

$$\bar{y}_0 = \frac{\Sigma y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras del análisis inicial.

Media aritmética para el análisis de cada condición de almacenaje.

$$\bar{y}_i = \frac{\Sigma y_i}{n}$$

n_i = número de muestras del análisis de la i-ésima condición de almacenaje.

DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN DE ALMACENAJE RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DEL ANÁLISIS INICIAL.

$$|d| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

Anexo 9. Fórmulas para la Robustez.

Media aritmética de la condición normal de operación.

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras de la condición normal de operación.

Media aritmética para el análisis de cada condición de operación diferente a la condición normal.

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

n_i = número de muestras del análisis de la i-ésima condición de operación.

DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN DE RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL.

$$|d| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9 ed. México: Secretaría de Salud, 2008; vol 1, 2: 9,2427-2434.
2. Loyd V. Science and technology of Pharmaceutical Compoundin. 2 ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2002: 231-233.
3. Swarbrick J, Boylan JC. Pharmaceutical Technology. Liquid oral preparations. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2002; vol 2: 1674 – 1683.
4. Moffat CA. Clarkes Analysis of Drugs and Poisons. 3 ed. London: Pharmaceutical press, 2004: 1391 - 1393, 1442,1443.
5. Maryadele J. The Merck Index. 14 ed. USA: Merck Co, 2006: 9, 1257.
6. Gennaro A. Remington Farmacia. 20 ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2003: 1541, 1730.
7. Martindale: Guía completa de consulta farmacoterapéutica. Barcelona: Pharma editores, 2003: 80, 795.
8. Katzung B. Farmacología básica y clínica. 9 ed. México: El Manual Moderno, 2005: 138, 593, 594.
9. Hiroki I, Toshiaki N, Tetsuji H, Masaharu T. Pharm. Pharmacol. Commun. 2000; 6: 495-500.
10. Solis JA. PLM: Diccionario de especialidades farmacéuticas. 52 ed. México: Thomson PLM, 2006: 1596, 1641.
11. Connors K. Curso de análisis Farmacéutico. 2 ed. Barcelona: Reverté, 1981: 195-205, 218-222.
12. Olsen E. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté, 1990: 87-89,94, 95.
13. Owen T. Fundamentals of modern UV-VIS spectroscopy. Alemania: Hewlett-Packard, 1996: 15.
14. Avendaño MC. Introducción a la Química Farmacéutica. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1993: 933, 936.
15. Skoog D, Holler FJ. Principios de Análisis Instrumental. 6 ed. México: Cengage Learning, 2008: 348-361, 180, 181.
16. Rouessac F. Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. Madrid: Mc Graw-Hill, 2003: 147, 148, 155, 159.
17. Mohrig J. Experimental Organic Chemistry. 2 ed. New York: WH Freeman and Company, 2006: 75-78.

18. Gilbert J. *Experimental Organic Chemistry*. 2 ed. USA: Colleague, 1998: 135-138.
19. Harris D. *Quantitative Chemical Analysis*. 7 ed. New York: WH Freeman and Company, 2007: 502-503.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de fármacos y medicamentos.
21. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
22. ICH Q2A. *Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures*. 1995: 2-3.
23. *United States Pharmacopeia*. 30 ed. National Formulary (25), Official Compendia of Standards; vol 1; 2007: 680-682.
24. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. *Métodos analíticos: Guía de Validación*, 2002: 8-38.
25. Knochen M, Giglio J, Reis BF. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 33: 191-197.
26. García A, Rupérez FJ, Maza A de la, Barbas C. *J. Chromatogr. B.* 2003; 85: 237-243.
27. Arancibia JA, Nepote AJ, Ecandara GM. *Anal. Chem.* 2000; 19: 159-168.
28. Chafetz L, Daly RE, Schrifman H, Lomner JJ. *Pharm. Sci.* 1971; 60: 463-466.
29. Saldivar Alvarado CM. *Preformulación y formulación para una solución pediátrica de clorhidrato de fenilefrina y paracetamol [Tesis para obtener el título de Químico farmacéutico Biólogo]*. 2010. Universidad Nacional Autónoma de México.