



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Evaluación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos ópticos para cuantificar la pureza de las sustancias de referencia secundaria de los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza

TESIS

Para la obtención del título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presentado por

Alison Andrea Reyes Montes de Oca

Director: M en A. Teresa Benítez Escamilla

Asesor: Q.F.B Mónica Elizabeth Mendoza Jacobo

Ciudad de México, Junio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por otorgarme los cimientos y herramientas necesarias para forjarme como profesionalista, así como también por facilitar el desarrollo de la presente tesis por medio de los recursos proporcionados.

A mi directora M. en A. Teresa Benítez Escamilla y asesora Q.F.B Mónica Elizabeth Mendoza Jacobo por su compromiso, conocimiento y apoyo incondicional brindado durante el desarrollo y conclusión del proyecto.

A mis sinodales, M. en A. Marisol Gandarillas Ortiz de Montellano, Q.F.B Blanca Irene Cruz Peralta y Q.F.B María del Rocío Hilda Galicia Rosas, por su participación y aportaciones realizadas para la mejora del contenido de la tesis.

Al Laboratorio de Espectrofotometría L-324, en especial a la Dra. Alberta Lourdes Castillo Granada, por llevar a cabo los espectros infrarrojos de las sustancias utilizadas en el proyecto.

A la Dra. Leticia Cruz Antonio y Q.F.B Irma Alejandre Razo por facilitar la utilización del espectrofotómetro PERKIN-ELMER.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis con todo mi amor y cariño a mis padres, Eustolia Leticia Montes de Oca Gómez y Jerónimo Reyes Hernández, quienes han sido la piedra angular de mi formación académica y personal. Agradezco sus consejos, palabras de aliento, desvelos, esfuerzos, preocupaciones, la fuerza que me brindaron para continuar ante cualquier adversidad, el amor que me han dado y todos los sacrificios que han hecho por mí. Este camino no hubiese sido el mismo sin ustedes a mi lado. Son el mejor regalo que me ha dado la vida.

A mi hermana, Ariadna Leticia Reyes Montes de Oca, quien ha permanecido a mi lado en los mejores y peores momentos de mi vida, tendiéndome la mano cuando más lo he necesitado. Gracias por ser mi fiel compañera.

A mi tía, Guadalupe Montes de Oca Gómez, quien siempre me brindó su ayuda sin dudar, estuvo orgullosa de mis logros y confió en mis capacidades para alcanzar las metas que me proponía. Con cariño te recuerdo y espero poder honrar tu memoria.

A mi tía Gabriela Alejandra Montes de Oca Gómez, quien ha sido una persona muy atenta conmigo, apoyándome constantemente a lo largo de mi vida.

A todos y cada uno de los amigos que hice en la Facultad, en especial a Valentina Zamora Xolo, con quien he pasado momentos agradables desde el inicio de la carrera.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Marco teórico.....	3
1. Materiales de referencia (MR).....	3
2. Sustancia de referencia.....	5
3. Métodos analíticos.....	13
4. Espectrofotometría UV-Vis.....	15
5. Validación de métodos analíticos.....	17
6. Propiedades de las sustancias de referencia a evaluar.....	23
III. Planteamiento de problema.....	28
IV. Hipótesis.....	30
V. Objetivos.....	31
VI. Material y equipo.....	32
VII. Metodología.....	
1. Diagrama de flujo.....	35
2. Procedimiento.....	36
VIII. Resultados.....	48
IX. Análisis de resultados.....	78
X. Conclusiones.....	83
XI. Sugerencias.....	84
XII. Referencias.....	85
XIII. Anexos.....	92
Anexo 1: Glosario de conceptos básicos de metrología	
Anexo 2: Espectros de absorción de las materias primas como ensayo de identidad	
Anexo 3: Espectros infrarrojo de las materias primas como ensayo de identidad	
Anexo 4: Cromatografía en capa fina de p-Aminofenol	
Anexo 5: Especificidad del método para las sustancias de referencia secundarias	
Anexo 6. Formato y metodologías analíticas desarrolladas	

I. INTRODUCCIÓN

Las mediciones siempre han permeado en una gran variedad de aspectos dentro de nuestra vida cotidiana. La acción de medir surge desde la época rudimentaria del hombre; sin embargo, conforme al paso de los años, esta práctica ha evolucionado, haciéndose cada vez más eficaz. Por consiguiente, como parte de una normalización de los parámetros medibles surgidos a lo largo de los años, se han buscado herramientas cuyas características les permitan ser reconocidas como un punto de comparación o patrón de referencia. Gracias a la confiabilidad que generan dichos patrones en el ejercicio de medición, su campo de aplicación puede presenciarse en ciencias tales como la física, microbiología, química, entre otras.

La química analítica está relacionada directamente con las mediciones y es por ello que las llamadas sustancias de referencia, como patrón de comparación, han sido implementadas con el objetivo de obtener resultados analíticos reproducibles y precisos. Podemos ver su aplicación en métodos como valoraciones, pruebas límite, ensayos de identidad, calibración directa de instrumentos, aseguramiento de la calidad interna y externa, entre otros.

Las sustancias de referencia son productos de uniformidad conocida y con un alto grado de pureza, motivo por el cual su producción se encuentra regulada y vigilada por instancias nacionales e internacionales con el objetivo de velar que sean productos poseedores de una calidad adecuada, además de que cumplan con los requisitos necesarios para el uso al que serán destinadas. El porcentaje de pureza de una sustancia de referencia es un aspecto importante que debe ser evaluado por medio de métodos analíticos normalizados tal y como se indica en la guía ISO 17034:2016 Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia y en la Serie de Informes Técnicos de la Organización Mundial de la Salud No. 885 y No. 957; en caso de ser métodos internos o desarrollados por una instancia deberá demostrarse que son aptos, mediante la validación, de acuerdo con lo descrito en la normatividad internacional existente. Por ende, la validación del método juega un

papel importante para el aseguramiento de las características que delinear la peculiaridad de las sustancias de referencia.

En los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza, se cuenta con un programa para habilitar sustancias de referencia secundarias con fines docentes; esto surge a partir de la necesidad de dotar con herramientas al alumnado en materia de métodos analíticos, además de ser una opción viable ante los elevados costos de los estándares primarios. Como parte del programa, se llevan a cabo controles de calidad continuos de las sustancias, dentro de los cuales se encuentra la determinación de su porcentaje de pureza, por medio del uso de métodos ya sea farmacopeicos o internos; estos últimos deberán demostrar su aptitud de uso, como se ha mencionado anteriormente. Por tal motivo se desarrollarán métodos analíticos destinados a cuantificar por espectrofotometría UV-VIS la pureza de las sustancias de referencia ranitidina, indometacina, ácido acetilsalicílico y guaifenesina, además del producto de degradación habilitado p-aminofenol, y se evaluarán sus parámetros de desempeño con la finalidad de implementar dichos métodos en el mantenimiento y evaluación de las sustancias de referencia.

II. MARCO TEÓRICO

1. Materiales de referencia (MR)

1.1 Definición

Material que será lo suficientemente homogéneo y estable, con respecto a la valoración de una o más de sus propiedades especificadas, ya sean cualitativas o cuantitativas. Debido a lo anterior, son considerados como patrones de medida. Será importante incluir su trazabilidad, origen y proceso empleado para su obtención como parte de sus especificaciones. Pueden presentarse en forma gaseosa, líquida o sólida, en mezcla o puros. ^(1,2,3)

1.2 Clasificación

Los materiales de referencia pueden clasificarse con base en su campo de aplicación en cuatro categorías principales, con sus respectivas sub-categorías (Figura 1).

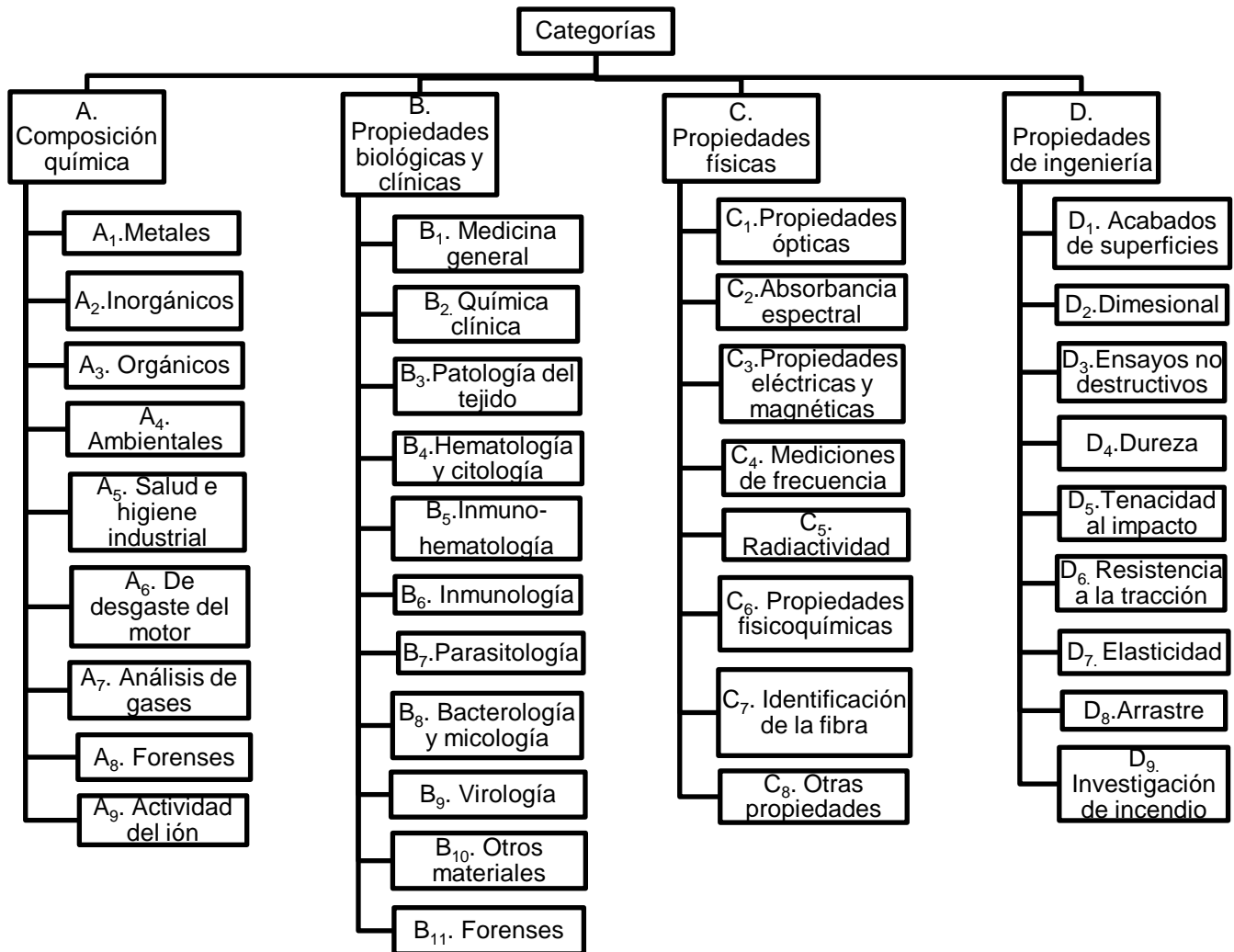


Figura 1. Clasificación de los materiales de referencia por categorías y sub-categorías.⁴ (Elaboración propia)

1.3 Materiales de referencia certificados (MRC)

Material de referencia cuya caracterización de una o más de sus propiedades especificadas (aspecto, contenido de humedad, pureza, ensayo de identidad, entre otras) es realizada por medio de procedimientos validados metrológicamente; acompañados por un documento que proporciona el valor de la propiedad especificada, su incertidumbre asociada y trazabilidad. ^(1,2)

El organismo que emite dicha documentación deberá estar autorizado, acreditado y técnicamente competente, es decir, que cuenta con los recursos y experiencia para realizar este tipo de trabajo. ^(1,5)

1.4 Aplicaciones

El campo de aplicación de los materiales de referencia es diverso, podemos ver su aplicación en: Ingeniería de materiales, ciencias forenses, geología, agricultura, salud e higiene, alimentos, combustibles, medio ambiente, entre otros. ⁽⁶⁾

Algunos ejemplos de los materiales de referencia en sus diversos campos de aplicación son: Cartas de colores, cigarrillos estándar para pruebas de fuerza y resistencia de ignición, polímeros, materiales especiales nucleares, aire continental y oceánico, materiales termoeléctricos, entre otros. ^(2,3)

De acuerdo con la clasificación mostrada en la Figura 1, las sustancias de referencia se encuentran incluidas en la categoría A (compuestos químicos) y en las sub-categorías A₂ y A₃ (compuestos puros orgánicos e inorgánicos respectivamente). En el ámbito farmacéutico son un común denominador de los materiales de referencia. ⁽²⁾

2. Sustancias de referencia

2.1 Definición

Son productos de uniformidad reconocida, destinados para utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las de la sustancia en evaluación. Poseen un grado de pureza correspondiente al empleo destinado. ^(7,8)

2.2 Clasificación

Las sustancias de referencia se pueden clasificar de acuerdo a su origen, trazabilidad y procedencia. En la Figura 2 se muestra el desglose de dicha clasificación.

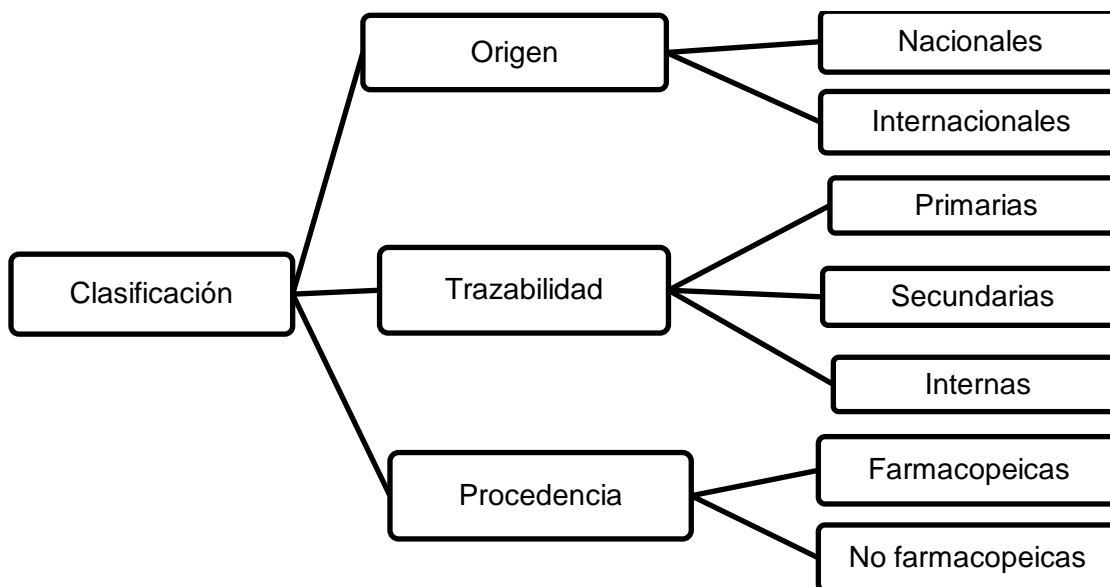


Figura 2. Clasificación de las sustancias de referencia. ^(1,9) (Elaboración propia).

2.2.1 Origen

2.2.1.1 Internacionales

Son sustancias producidas por centros especializados, establecidas y reconocidas internacionalmente por recomendación del Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS); se suministran principalmente para su uso en pruebas y ensayos físicos y químicos descritos en la Farmacopea Internacional o propuestas en monografías preliminares. ^(10,11)

2.2.1.2 Nacionales

Son sustancias producidas por la colaboración de autoridades sanitarias, instituciones de investigación, laboratorios oficiales y/o privados nacionales, quienes participan conjuntamente en la obtención, análisis químico, estudios y desarrollo de éstas, apoyándose en un protocolo analítico previamente establecido. ⁽¹²⁾

2.2.2 Trazabilidad

2.2.2.1 Sustancia de referencia primaria

Sustancia ampliamente reconocida por poseer las cualidades apropiadas dentro de un contexto especificado y cuyo contenido asignado es aceptado sin requerir comparación con otra sustancia química. ⁽¹³⁾

2.2.2.2 Sustancia de referencia secundaria

Sustancia cuyas características son asignadas y/o calibradas por comparación con una sustancia de referencia primaria. El grado de caracterización y análisis de una sustancia de referencia secundaria puede ser menor que para una sustancia de referencia primaria. ⁽¹⁷⁾

2.2.2.3 Sustancia de referencia interna de trabajo

Sustancia desarrollada por una organización o laboratorio para su uso interno. ⁽¹³⁾

2.2.3 Procedencia

2.2.3.1 Farmacopeico

Es una sustancia de referencia que posee uniformidad reconocida y que se encuentra referenciada dentro de una monografía especificada en una Farmacopea como la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), British Pharmacopoeia (BP), European Pharmacopoeia (EP), Japanese Pharmacopoeia (JP), entre otras. ⁽¹⁾

2.2.3.2 No farmacopeico

Son todas aquellas sustancias de referencia que no se encuentran referenciadas en alguna Farmacopea. Empresas como LGC Standards (Laboratory of the Government

Chemist), SynFine Standards, Toronto Research Chemicals (TRC), Resource Technology Corporation (RTC), son productoras de este tipo de sustancias. ⁽¹⁾

2.3 Aplicaciones

Las sustancias de referencia son utilizadas para fines cuantitativos, cualitativos y específicos. En la Figura 3 se muestran algunos ejemplos de dichos fines.

Usos cuantitativos	Usos cualitativos	Usos específicos
<ul style="list-style-type: none">• Valoraciones.• Validación y revalidación de métodos.• Desarrollo de métodos de referencia.• Trazabilidad de las mediciones.• Calibración directa de instrumentos.• Aseguramiento de la calidad interna y externa.	<ul style="list-style-type: none">• Pruebas de identificación (como espectros UV/VIS o espectros IR)• Pruebas de aptitud del sistema.• Marcadores de picos cromatográficos.	<ul style="list-style-type: none">• Estándares de verificación de desempeño, punto de fusión y el set de conteo para partículas.

Figura 3. Aplicaciones de las sustancias de referencia ⁽¹⁴⁾. (Elaboración propia).

2.4 Proceso de obtención de las sustancias de referencia

2.4.1 Planeación

Dentro de la planeación para producir una sustancia de referencia, es recomendable el manejo de un protocolo de trabajo, donde deberán definirse aspectos como las condiciones de producción y almacenamiento óptimas, la selección de la materia prima (muestreo), verificación y calibración del equipo, los métodos de medición y/o cuantificación, el plan de validación para dichos métodos, homogeneidad, las especificaciones, número de réplicas por análisis, entre otros. ^(9,15)

2.4.2 Producción

El material de partida debe tener calidad satisfactoria y puede elegirse partiendo de un lote de la sustancia, obtenido en un proceso normal de producción (en caso de contar con un grado de pureza aceptable) o a partir de su síntesis. ^(13,16)

La cantidad del material de partida deberá ser suficiente para su procesamiento, contemplando el número de muestras necesarias para su caracterización, purificación (cristalización y/o destilación), homogenización, análisis cualitativos para verificar el tipo e identidad de dicho material, así como controles de proceso tales como la distribución del tamaño de partícula y la humedad. ^(13, 15)

2.4.3 Evaluación

2.4.3.1 Identidad y pureza

Las sustancias de referencia son evaluadas utilizando métodos que permiten determinar su identidad y pureza (Figura 4). Dichos métodos deben estudiarse en relación con el uso al que se destinan, además de estar validados por las normas de idoneidad del sistema según proceda. ^(13,15)

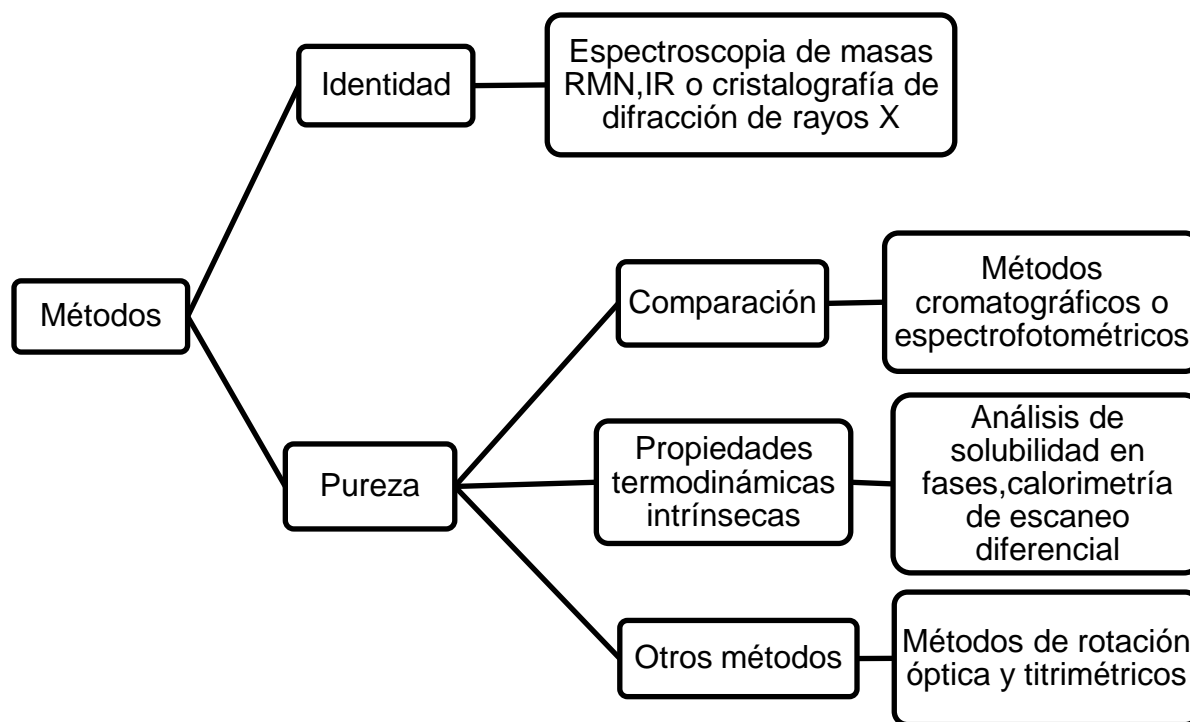


Figura 4. Métodos empleados para la evaluación de las sustancias de referencia. ⁽¹³⁾ (Elaboración propia).

A partir de los resultados de la determinación de la pureza, el estudio estadístico permitirá establecer el dato de pureza para la sustancia de referencia. Esta cumple con los criterios de aceptación si al realizar el análisis estadístico se tiene una desviación estándar relativa no mayor de 1.0 %. En general, el contenido asignado a

una sustancia química de referencia es del 100% menos el contenido de agua y sustancias volátiles. ⁽⁹⁾

2.4.3.2 Homogeneidad

La homogeneidad es un parámetro necesario en el proceso de certificación de un material de referencia; el productor de dicha sustancia deberá demostrar que existe suficiente uniformidad entre los lotes, a partir de un número óptimo de muestras, seleccionadas por medio de métodos estadísticamente validados. ^(15,16)

La evaluación se realizará con base a una característica o composición que se ajuste al propósito de dicha sustancia, además de incluir límites de heterogeneidad como patrón de comparación. ⁽¹⁶⁾

2.4.3.3 Estabilidad

La luz, humedad y oxígeno son algunos de los factores que pueden modificar las propiedades iniciales que poseen las sustancias de referencia y/o materiales de partida para su producción, por ello será prudente evaluar su estabilidad. Dicho estudio se realiza a corto y largo plazo, con la finalidad de evaluar las condiciones óptimas de transporte y almacenamiento respectivamente. ^(13,16)

Dentro de las pruebas que se emplean de modo generalizado para la evaluación de este parámetro se encuentran la cromatografía y calorimetría diferencial; debe tenerse presente el uso previsto y las características de rendimiento de los métodos analíticos en los que se utilizará la sustancia de referencia, ya que esto servirá para hacer las consideraciones pertinentes respecto a los cambios significativos que resulten críticos.

⁽¹⁶⁾

2.4.4 Acondicionamiento

Las sustancias químicas de referencia se deben acondicionar en frascos viales de vidrio color ámbar, con tapa y re-tapa que puedan contener de 500 mg a 2 g. Deberán ser almacenadas en las condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura para mantener su estabilidad, además de considerar su fecha de reanálisis. ⁽⁹⁾

Toda sustancia de referencia debe de contar con su identificación y registro. La información mínima para su identificación se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Información requerida para la identificación de sustancias de referencia primarias y secundarias.⁽¹⁷⁾

Sustancias de referencia primaria	Sustancias de referencia secundarias
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nombre ▪ Cantidad ▪ Lote del producto ▪ Clave ▪ Fecha de adquisición ▪ Pureza ▪ Fecha de caducidad ▪ Riesgo potencial de manejo ▪ Indicaciones especiales 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nombre ▪ Cantidad certificada ▪ Lote interno ▪ Clave ▪ Fecha de certificación ▪ Potencia en relación con la sustancia de referencia

2.5 Procedencia de las sustancias de referencia

La disponibilidad y distribución de las sustancias de referencia está a cargo de diversas organizaciones, tanto nacionales como internacionales. A continuación se mencionan algunas de ellas: Organización Mundial de la Salud (OMS), National Institute for Standards and Technology (NIST), Analytical Reference Standards. (ARS), Comité Mexicano de Sustancias Farmacéuticas de Referencia. (COSUFAR), International Chemical Reference Substances. (ICRS), entre otras.⁽¹⁸⁾

Este servicio también es proporcionado por proveedores farmacopeicos:⁽¹⁸⁾

- British Pharmacopoeia chemical reference substances. (BPCRS)
- Swiss Pharmacopoeia Reference Substances. (SPRS)
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (FEUM)
- European Pharmacopoeia. (EP)
- French Pharmacopoeia Reference Substances. (FPRS)
- Indonesian Pharmacopoeia Reference Substances.(INORS)
- Japanese Pharmacopoeia Reference Standard.(JPRS)
- U.S. Pharmacopeial Convention (USP)

2.6 Normatividad

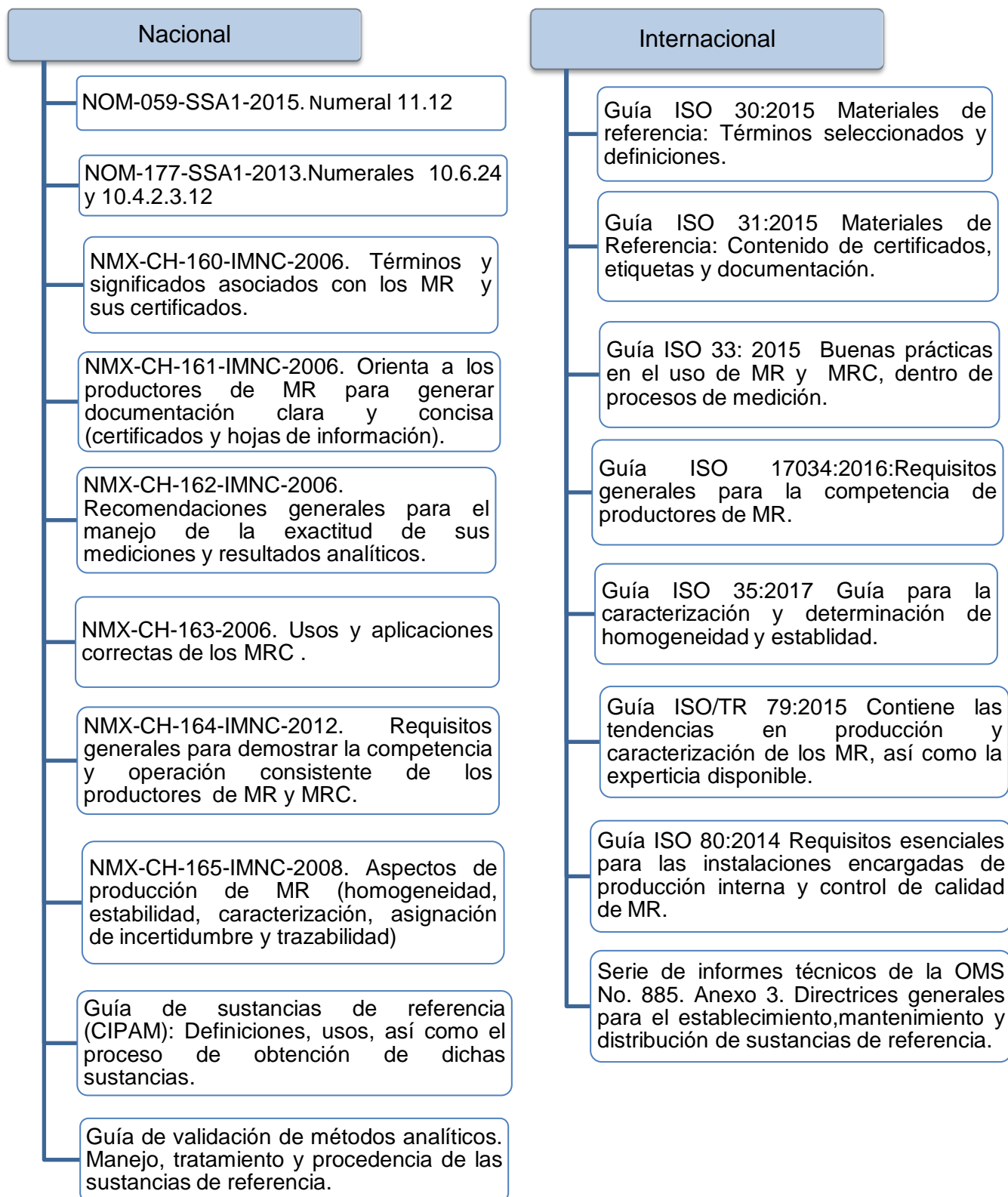


Figura 5. Normatividad nacional e internacional relacionada con las sustancias de referencia. (2,7,9,13,18-29)
(Elaboración propia)

Como se muestra en la Figura 5, dentro de dos Normas Oficiales Mexicanas se hace mención de las sustancias de referencia. El numeral 11.12 de la NOM-059-SSA1-2015 indica que tanto las sustancias primarias como las secundarias deben fecharse, manejarse y utilizarse bajo condiciones que no afecten su calidad, también será necesario que cuenten con el registro de al menos su origen, lote e identificación. ⁽²²⁾

En el caso de la NOM-177-SSA1-2013, los numerales 10.6.24 y 10.4.2.3.12 hacen énfasis en las condiciones de almacenamiento controladas, además de mencionar que estas sustancias deben de contar con un certificado de análisis, trazabilidad, balance y estar vigentes. También se recomienda hacer uso de sustancias de referencia primarias, o sustancias de referencia secundaria con trazabilidad a una primaria para los análisis propios de la norma. En caso de no existir una fuente oficial o comercial para proveer una determinada sustancia de referencia, el numeral 10.6.24.4 amplía las opciones del usuario sugiriendo el empleo de una sustancia con pureza conocida, preparada y estandarizada por un laboratorio analítico o por el proveedor del fármaco.⁽⁷⁾

Cabe mencionar que existe un proyecto de norma dedicado a las sustancias de referencia químicas (PROY-NOM-104-SSA1-1994) el cual tiene como objetivo determinar las especificaciones sanitarias del manejo de sustancias químicas de referencia e incluye aspectos como las condiciones de almacenamiento, identificación y registro de éstas. ⁽¹¹⁾

La serie de guías ISO incluye un conjunto de requisitos y recomendaciones que involucran a los materiales de referencia, desde las condiciones para su producción, caracterización, los lineamientos sugeridos para los productores de estos materiales, entre otros aspectos. Cada una de las guías ISO posee su homóloga dentro de las normas mexicanas que se mencionan en la Figura 5.

3. Métodos analíticos

3.1 Definición

Son aquellos que abarcan la descripción de los recursos, materiales, secuencia de actividades y parámetros a cumplir con el objetivo de analizar un componente específico en una muestra(s). ⁽³⁰⁾

3.2 Clasificación

Los métodos analíticos pueden clasificarse considerando su sistema de medición, fundamento o principio analítico e incluso el marco regulatorio bajo el cual se llevó a cabo su desarrollo (Figura 6).

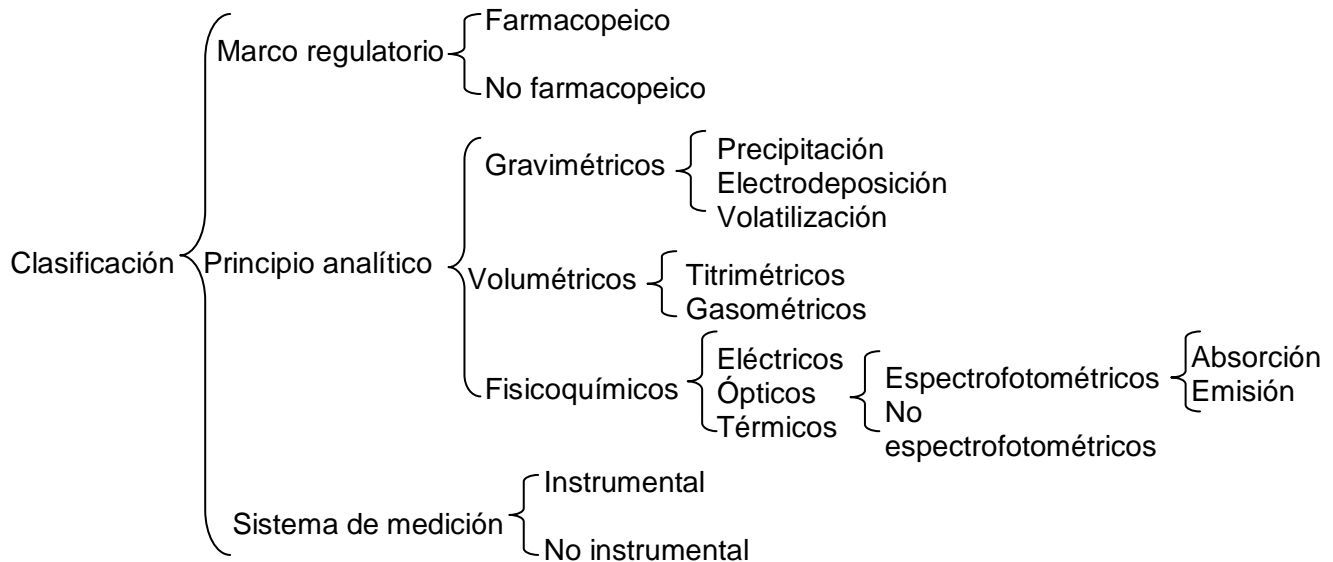


Figura 6. Clasificación de los métodos analíticos en función de su marco regulatorio, sistema de medición y principio analítico ⁽³¹⁻³⁵⁾ (Elaboración propia)

3.2.1 Métodos no farmacopeicos

Son aquellos procedimientos alternativos propuestos para ser utilizados en lugar de los métodos regulatorios o farmacopeicos. Estos métodos deberán ser validados, para lo cual hay que considerar en primera instancia, si dicho método presenta un desempeño igual o mejor que un procedimiento farmacopeico. ^(32,33)

3.2.2 Métodos instrumentales

Son aquellos métodos basados en las interacciones materia-energía, que hacen uso de algún instrumento para realizar una medición; para este tipo de métodos no será esencial que se genere una reacción química. ⁽³⁴⁾

3.2.3 Métodos fisicoquímicos

Son aquellos métodos que evalúan un sistema, a través de muestras que derivan de éste, estableciendo una relación cuantitativa con la cantidad del constituyente que se busca determinar basándose en las interacciones entre la energía y materia. ⁽³⁰⁾

3.2.4 Métodos ópticos

Son aquellos métodos fundamentados en las propiedades de la energía radiante; miden la radiación electromagnética que emana de la materia o que interacciona con ella. Se dividen en dos grupos: Espectrofotométricos y no espectrofotométricos. ^(30,31)

3.2.5 Métodos espectrofotométricos

Son aquellos métodos que miden la interacción de los átomos, moléculas e iones con el campo electromagnético. Dichas interacciones implican fenómenos como la absorción, emisión y transmisión de la radiación electromagnética a una determinada longitud de onda, abarcando desde los rayos gamma hasta las ondas de radio. Estos métodos se caracterizan por la obtención de espectros debido a las transiciones electrónicas originadas entre distintos niveles electrónicos ⁽³⁵⁾

3.2.6 Métodos de absorción

Se basan en la absorción selectiva de radiación electromagnética por la misma especie a determinar o por un producto de transformación de dicha especie; cuando la absorción se lleva a cabo a nivel molecular, las transiciones se producen entre niveles electrónicos, vibracionales y rotacionales, por absorción de radiación ultravioleta, visible, infrarroja y de microondas. ⁽³⁴⁾

4. Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-VIS)

4.1 Fundamento

La radiación electromagnética está conformada por oscilaciones de campos eléctricos y magnéticos perpendiculares entre sí y se propaga en forma de fotones de distintas energías a través del espacio a la velocidad de la luz; el espectro electromagnético, a su vez, será el conjunto de todas las frecuencias posibles a las que se produce dicha radiación ^(36,37, 38)

Cuando una molécula está expuesta a la radiación electromagnética correspondiente a la región visible (380-780 nm) y ultravioleta (200-380 nm) del espectro electromagnético, ésta presentará un proceso de absorción selectiva a una frecuencia característica, generando así la excitación de un electrón y promoviendo la transición de éste hacia un estado de energía superior, siempre que exista un orbital vacío en la energía correcta. ^(36, 39,40)

Al tratarse de compuestos orgánicos, la absorción de la radiación electromagnética se debe a la excitación de dos tipos de electrones (compartidos y no compartidos). Aquellos electrones que participan en la formación de dobles o triples enlaces serán más fáciles de excitar, ya que se encuentran sujetos con menor fuerza. A los grupos funcionales orgánicos que poseen ésta característica se les conoce como cromóforos y serán de gran importancia durante la cuantificación por espectrofotometría UV-VIS. ⁽³⁹⁾

4.1.1 Espectrofotómetro

Las mediciones analíticas propias de la espectrofotometría se llevan a cabo empleando como instrumento el espectrofotómetro, el cual opera de la siguiente forma:

De la luz que procede de una fuente estable se aísla una región reducida de longitudes de onda empleando un monocromador, la cual pasa a través de una muestra. Un detector o transductor convertirá la energía radiante en una señal medible que será procesada y leída posteriormente. ^(39,40)

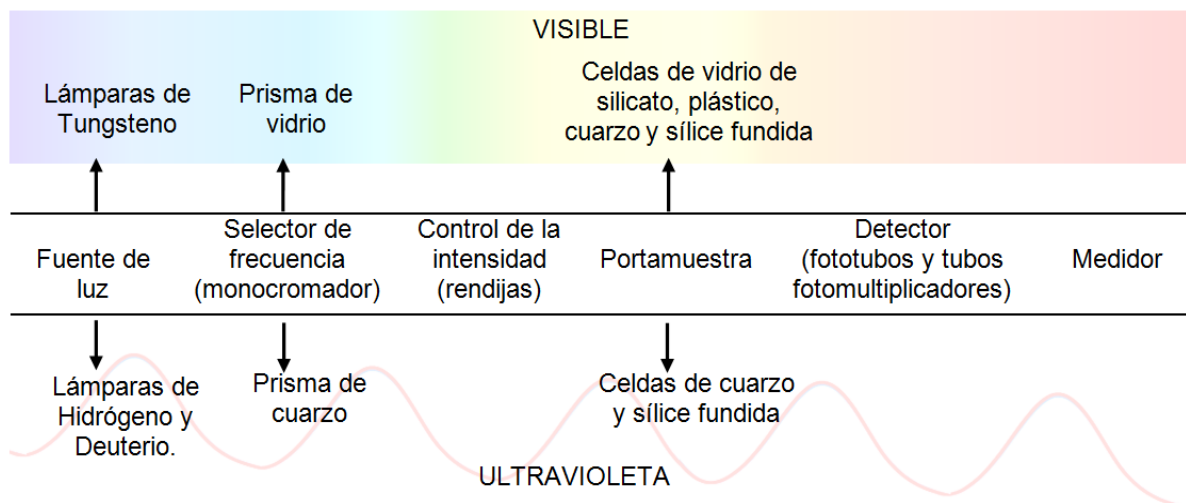


Figura 7. Componentes de un espectrofotómetro ^(39,41) (Elaboración propia)

4.2 Ley de Lambert-Beer

Esta ley se compone por el siguiente enunciado:

“La fracción de luz absorbida y, por consiguiente, la fracción de luz saliente por transmisión que se hace incidir sobre una muestra analítica, estará relacionada con el espesor y la concentración de la muestra.” ^(39,42)

Por lo tanto y de acuerdo al enunciado anterior, se establece que la absorción de luz está relacionada con dos características importantes, el camino que esta recorre (Lambert, 1760) y la concentración de la fase absorbente (Beer, 1852).

La ley de Lambert-Beer se deduce a partir de dos postulados principalmente:

- Cada cuanto de luz que penetra en la solución es capaz de ser absorbido. Esto implica que la luz es monocromática.
- Cada molécula de la sustancia tiene igual oportunidad de interceptar y absorber un cuanto de luz. Esto implica que la solución es suficientemente diluida para que ninguna molécula quede oculta en la sombra de otra. ⁽⁴³⁾

5. Validación de métodos analíticos

5.1 Definición

Proceso mediante el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, la capacidad del método para satisfacer los requisitos de la aplicación analítica deseada, es decir, es apto para su uso indicado. ^(23,44,45)

5.2 Clasificación de los métodos analíticos para fines de validación

5.2.1 Categoría I

Métodos analíticos para cuantificar un componente específico en muestras de producto terminado, pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos u otros analitos de interés. Dentro de esta clasificación se encuentran los siguientes métodos: contenido, potencia y valoraciones.

5.2.2 Categoría II

Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. En esta categoría se incluyen las pruebas de impurezas, ya sean determinaciones cuantitativas (contenido/valoración) o pruebas límite.

5.2.3 Categoría III

Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución en cápsulas, liberación controlada en tabletas, etc.)

5.2.4 Categoría IV

Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés. ⁽⁸⁾

5.3 Parámetros de desempeño

Son aquellos criterios específicos a estudiar durante el transcurso de la validación. Se aplican tanto al método (Cuadro 2, 3, 4 y 5) como al sistema (Cuadro 6). ⁽²³⁾

5.3.1 Criterios aplicables al método

Cuadro 2. Parámetros de desempeño (linealidad y exactitud). (8,23,33,44,46,47)

Parámetro	Definición	Metodología	Número de categoría			
			I	II	III	IV
Linealidad del método.	Capacidad del método para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aplicación del método a una muestra (placebo o analito adicionados). ▪ Evaluación de 3 niveles (superior, inferior y central) de concentración por triplicado. ▪ Comparación con un método secundario caracterizado. 	x	x_p	x^n	
Exactitud.	Concordancia entre un valor aceptado como verdadero o de referencia y el valor obtenido.	<p><u>Fármacos.</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aplicación del método a un analito de pureza conocida. <p><u>Medicamento.</u></p> <p>Aplicación del método a:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Categoría I: Placebo + analito ▪ Categoría II: Impurezas + analito <p><u>Ambos casos.</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Comparación con un método secundario caracterizado. ▪ Evaluación de 3 niveles de concentración por triplicado o el nivel central de concentración (100%) por sextuplicado. 	x	x_p	x^n	

x^n = dependiendo de la naturaleza del método. x_p = para pruebas límite dependerá de su naturaleza.

Cuadro 3. Parámetros de desempeño (límite de cuantificación, detección y estabilidad).^(8,23,33,44,46,47)

Parámetro	Definición	Metodología	Número de categoría			
			I	II	III	IV
Límite de detección.	Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto, bajo las condiciones de operación establecidas.	<u>Métodos instrumentales.</u> Determinación por medio del procedimiento: ▪ Señal-ruido. ▪ Linealidad (3 niveles de concentración por triplicado). <u>Métodos no instrumentales.</u> ▪ Linealidad (3 niveles de concentración por triplicado).		x_b		
Límite de cuantificación.	Concentración mínima del analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas, bajo las condiciones de operación establecidas.	<u>Métodos instrumentales.</u> Determinación por medio del procedimiento: ▪ Señal-ruido. ▪ Linealidad (3 niveles de concentración por triplicado). <u>Métodos no instrumentales.</u> ▪ Linealidad (3 niveles de concentración por triplicado).		x_a		
Estabilidad.	Capacidad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica, después de someterse a determinadas condiciones de almacenamiento.	Establecer etapa de análisis y condiciones de almacenaje de interés, determinando si se trata de: <u>Muestras dependientes.</u> ▪ Fraccionar muestra (triplicado). <u>Muestras independientes.</u> ▪ Muestra homogénea (triplicado).	x	x_a		
x_b =solo en pruebas límite; x_a = solo en determinaciones cuantitativas.						

Cuadro 4. Parámetros de desempeño (precisión). ^(8,23,33,44,46,47)

Parámetro	Definición	Metodología	Número de categoría			
			I	II	III	IV
Repetibilidad.	Expresa la variabilidad analítica bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo, obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista.	<ul style="list-style-type: none"> ▪Evaluación de 3 niveles de concentración por triplicado o 100% por sextuplicado. 	x	x_a	x	
Reproducibilidad intralaboratorio.	Concordancia relativa obtenida a largo plazo a partir de determinaciones realizadas independientemente, bajo la implementación de variaciones en las mediciones.	<p>Análisis del nivel correspondiente al 100% por triplicado bajo condiciones de diferentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪Días. ▪Analistas. ▪Equipos. 	x	x_a	x	
Reproducibilidad interlaboratorio.	Concordancia entre las determinaciones realizadas por diferentes laboratorios.	<p>Análisis generando variaciones en los siguientes aspectos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪Equipos. ▪Laboratorios. ▪Analistas. ▪Días. 	x	x_a	x	

x_a = solo en determinaciones cuantitativas.

Cuadro 5 .Parámetros de desempeño (tolerancia, robustez, rango y especificidad). (8,23,33,44,46,47)

Parámetro.	Definición	Metodología	Número de categoría			
			I	II	III	IV
Tolerancia.	Reproducibilidad de los resultados obtenidos de una misma muestra bajo diferentes parámetros de operación.	▪Establecer y analizar factores externos que generen un efecto significativo en el desempeño del método por triplicado.	x ⁿ	x ⁿ	x ⁿ	
Robustez.	Medición de la capacidad del método para mantenerse inalterado ante variaciones pequeñas, pero deliberadas bajo parámetros normales de operación.	▪Establecer y analizar aquellos factores instrumentales relacionados al propio método, considerados críticos por triplicado.	x ⁿ	x ⁿ	x ⁿ	
Rango.	Intervalo comprendido por la concentración menor y mayor, para las cuales se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.	▪Medición de 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés.	x	x		
Especificidad /selectividad.	Capacidad de evaluar inequívocadamente al analito deseado, obteniendo una respuesta únicamente debida a éste y no a otros componentes presentes (especificidad) o generados por efectos ambientales y/o interacciones entre los mismos componentes (selectividad).	▪Uso de las propiedades únicas del analito para su detección. ▪Adición intencional y evaluación de las interferencias específicas. ▪Comparar la habilidad del método para medir al analito con otros métodos independientes.	x	x	x ⁿ	x

xⁿ= dependiendo de la naturaleza del método.

5.3.2 Criterios aplicables al sistema

Cuadro 6. Parámetros de desempeño como parte de la evaluación del sistema. (8,23,46)

Parámetro	Definición	Metodología	Número de categoría			
			I	II	III	IV
Linealidad del sistema.	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.	Evaluación de 5 niveles de concentración; cada nivel por triplicado.	x	x_p	x^n	
Precisión del sistema.	Grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.	Evaluación de nivel central de concentración (100%) por sextuplicado.	x	x_p		
Verificación del sistema.	Son pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente, con base a criterios previamente establecidos.	Establecimiento y análisis de las características relacionadas con el funcionamiento correcto del sistema de medición.	x^n	x^n	x^n	

x^n = dependiendo de la naturaleza del método. x_p = para pruebas límite dependerá de su naturaleza.

6. Propiedades de las sustancias de referencia a evaluar

6.1 Ácido acetilsalicílico

Peso molecular: 180.2 g/mol

Polvo cristalino, gránulos o cristales incoloros o blancos, es fácilmente soluble en etanol (1 en 5 partes), soluble en cloroformo (1 en 17 partes), éter dietílico (1 en 10 partes), en acetatos, citratos y en soluciones alcalinas (hidróxidos y carbonatos), aunque sufre descomposición en éstas y ligeramente soluble en agua. Su temperatura de fusión se presenta de 138–140 °C. En presencia de humedad ambiental, gradualmente se hidroliza a ácido acético o salicílico. El grado de hidrólisis incrementa con el calor y es pH dependiente. ^(8, 48-50)

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Undécima edición, el método empleado para su cuantificación es por medio de una valoración ácido-base. ⁽⁸⁾

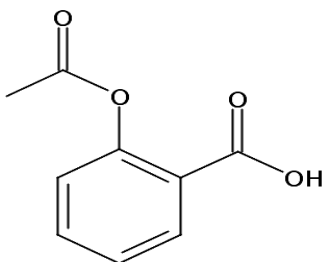


Figura 8. Estructura química del ácido acetilsalicílico ⁽⁵¹⁾

Sus valores de absorbancia específica son: ⁽⁴⁸⁾

En solución ácida.

- $A_1^1 = 466$ a (230 nm)
- $A_1^1 = 68$ a (278 nm)

En solución alcalina.

- $A_1^1 = 409$ b (231nm)
- $A_1^1 = 190$ b (298 nm)

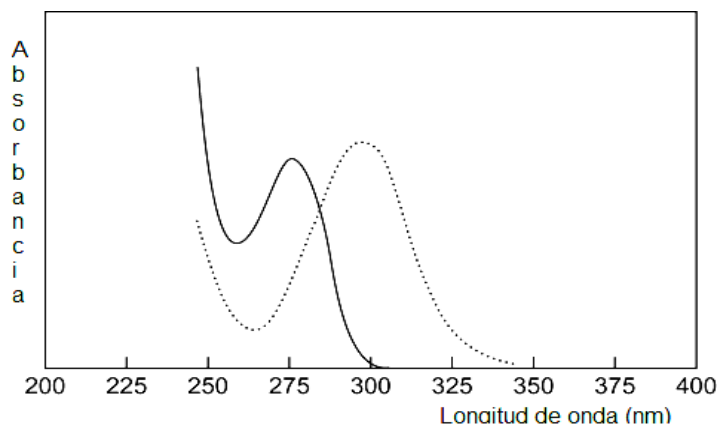


Figura 9. Espectro de absorción teórico del ácido acetilsalicílico. ⁽⁴⁸⁾

6.2 Indometacina

Peso molecular: 357.8 g/mol

Polvo cristalino de blanco a amarillo canela, soluble en cloroformo (1 en 30 partes) y acetona; ligeramente soluble en etanol (1 en 50 partes), metanol y éter dietílico; casi insoluble en agua. Su temperatura de fusión se encuentra entre 158 y 162 °C. Presenta polimorfismo, fotosensibilidad y es inestable en soluciones alcalinas. ^(8, 48,49)

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Undécima edición, el método empleado para su cuantificación es por medio de cromatografía líquida de alta resolución. ⁽⁸⁾

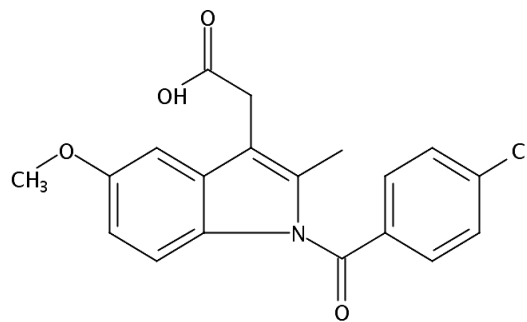


Figura 10. Estructura química de la indometacina. ⁽⁵¹⁾

Sus valores de absorbancia específica son: ⁽⁴⁸⁾

En solución alcalina.

- $A_1^1 = 213$ a (230 nm)
- $A_1^1 = 213$ a (279 nm)

En solución de HCl-metanol.

- $A_1^1 = 180$ a (318 nm)

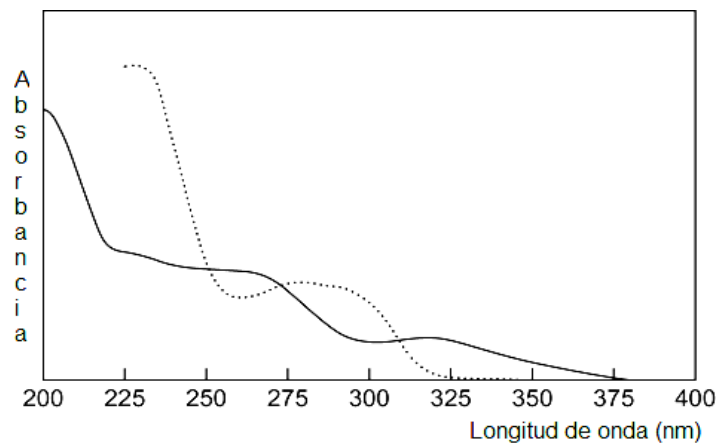


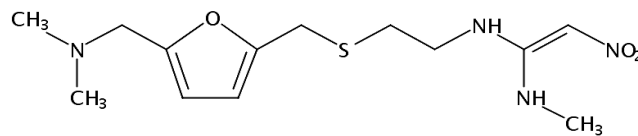
Figura 11. Espectro de absorción teórico de la indometacina. ⁽⁴⁸⁾

6.3 Clorhidrato de ranitidina

Peso molecular: 350.9 g/mol

Polvo amarillo-grisáceo, muy soluble en agua y ácido acético, fácilmente soluble en metanol, ligeramente soluble en etanol y prácticamente insoluble en cloroformo. Su temperatura de fusión se encuentra entre 133 y 134 °C. Puede precipitar con valores de pH mayores a 6.4 ^(8, 48,49, 52)

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Undécima edición, el método empleado para su cuantificación es por medio de cromatografía líquida de alta resolución. ⁽¹²⁾



• HCl

Figura 12. Estructura química del clorhidrato de ranitidina. ⁽⁵¹⁾

Sus valores de absorbancia específica son: ⁽⁴⁸⁾

En agua.

- $A_1^1 = 499$ a (313 nm)

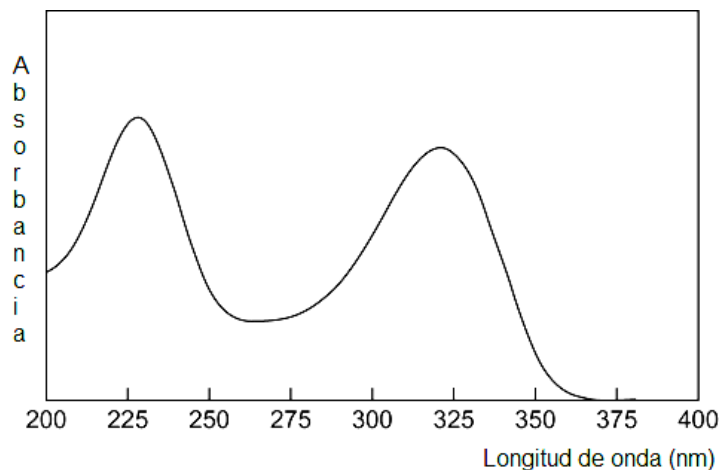


Figura 13. Espectro de absorción teórico del clorhidrato de ranitidina. ⁽⁴⁸⁾

6.4 Guaifenesina

Peso molecular: 198.2 g/mol

Cristales blancos o ligeramente grises, es soluble en agua (1 en 33 partes), etanol (1 en 11 partes), cloroformo (1 en 11 partes) y éter (1 en 100 partes); soluble en glicerol y propilenglicol; moderadamente soluble en benceno; prácticamente insoluble en éter de petróleo. Su temperatura de fusión se encuentra entre 78 y 82°C. No higroscópico, estable bajo condiciones de luz y calor; tiende a volverse grumoso tras su almacenamiento. ^(14,48,49)

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos de América 36 y el Formulario Nacional 31, el método empleado para su cuantificación es por medio de cromatografía líquida de alta resolución. ⁽¹⁴⁾

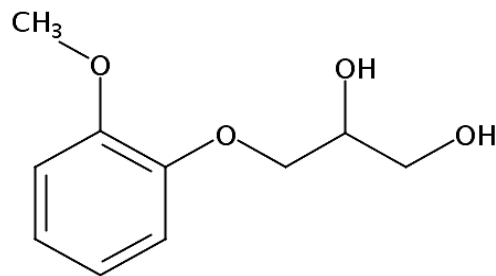


Figura 14. Estructura química de la guaifenesina. ⁽⁵¹⁾

Sus valores de absorbancia específica son: ⁽⁴⁸⁾

En solución acida.

- $A_1^{125} = 125$ a (273 nm)

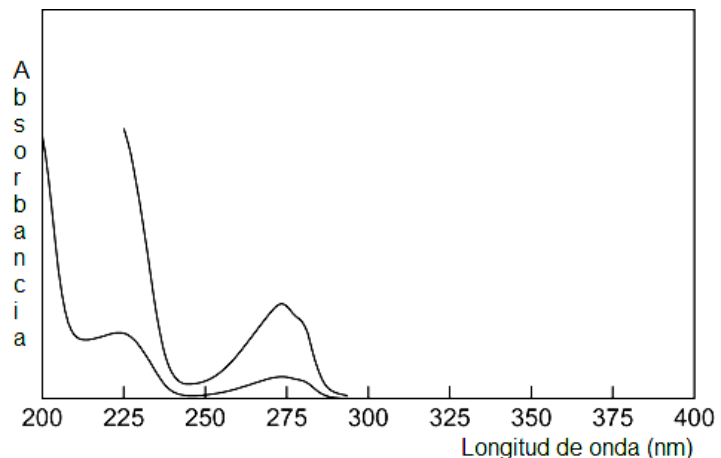


Figura 15. Espectro de absorción teórico de la guaifenesina. ⁽⁴⁸⁾

6.5 p-Aminofenol

Peso molecular: 109.1 g/mol

Polvo cristalino blanco o ligeramente coloreado, poco soluble en agua; soluble en etanol y prácticamente insoluble en cloroformo. Adquiere color tras su exposición al aire y a la luz, por lo cual se recomienda protegerlo de dichas condiciones. Su temperatura de fusión se encuentra entre 188-191. Es el producto de degradación del paracetamol. (48,49, 53)

Para esta sustancia, no hay una monografía que indique algún método de cuantificación, únicamente se hace mención de sus características, como en el caso de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (8)

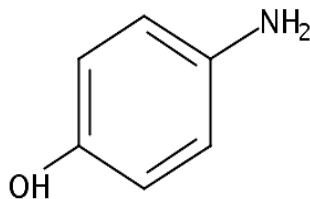


Figura 16. Estructura química del p-aminofenol. (51)

Los valores de absorbancia específica son: (48)

En solución ácida.

- $A_1^1 = 133 \text{ b (271 nm)}$

En solución alcalina.23

- $A_1^1 = 731 \text{ b (266nm)}$

En metanol.

- $A_1^1 = 587 \text{ b (233 nm)}$
- $A_1^1 = 171 \text{ b (303 nm)}$

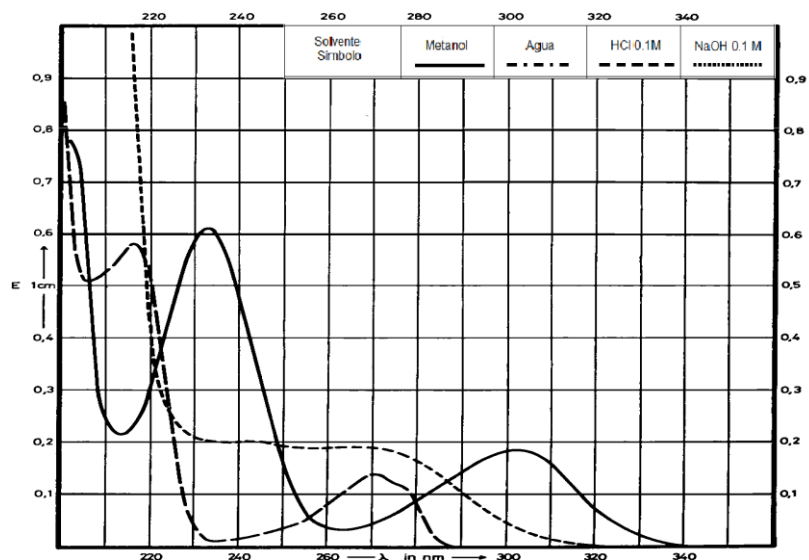


Figura 17. Espectro de absorción experimental del p-aminofenol. (54)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las sustancias de referencia son aquellas que poseen un alto grado de pureza y uniformidad; dichas características les permiten ser utilizadas como punto de referencia con respecto a otras sustancias dentro de análisis químicos, biológicos o físicos. Uno de sus campos de aplicación se encuentra dentro de la Química Analítica, donde se incluyen en una amplia cantidad de métodos, tanto cuantitativos como cualitativos.

Debido a su imperante presencia en los métodos analíticos, éstas deben encontrarse en las condiciones óptimas para su uso, esto incluye la evaluación periódica de parámetros tales como su porcentaje de pureza, de modo que se asegure su homogeneidad. De acuerdo con la Serie de Informes Técnicos de la OMS No. 885 y 957 y la guía ISO 17034:2016 Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia, los métodos empleados para la caracterización y evaluación de las sustancias de referencia, deberán estar validados antes de ser empleados.

Es importante señalar que existen sustancias de referencia primarias y secundarias. Las primeras poseen cualidades tales que no requieren comparación con otras sustancias, mientras que las segundas son habilitadas a partir de una sustancia primaria. En los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza existe un programa que busca en primera instancia, habilitar sustancias de referencia secundaria y posteriormente evaluarlas periódicamente con la finalidad de asegurar su calidad. La implementación de dicho programa es de suma importancia a nivel docencia considerando el extenso panorama en el que se ven involucradas dentro del análisis químico, además del elevado costo que puede alcanzar el uso de sustancias de referencia primarias, las cuales son provistas en minúsculas cantidades. Como ejemplo podemos mencionar que 400 mg de paracetamol como estándar primario proveniente de la USP, tiene un costo de \$13,992 MNX.

La evaluación de las sustancias de referencia ya habilitadas se realiza empleando métodos descritos en su respectiva monografía farmacopeica. Ensayos de identidad y determinación del porcentaje de pureza para demostrar su homogeneidad son algunos ejemplos. No obstante, existen problemáticas que rodean los métodos empleados para

evaluar su pureza; ya sea que se describen métodos volumétricos, cuya sensibilidad no es adecuada, o no se cuenta con el equipo necesario para llevar a cabo las determinaciones, como es el caso del análisis empleando CLAR. Aunado a esto y como se mencionó con anterioridad, la normatividad que rige las sustancias de referencia demanda la validación de los métodos a utilizar.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se desarrollarán y evaluarán los parámetros de desempeño de los métodos analíticos destinados a cuantificar, por espectrofotometría UV-VIS, la pureza de algunas de las sustancias de referencia secundarias de mayor demanda por el alumnado (de acuerdo con los registros de las cantidades utilizadas), éstas son: ranitidina, indometacina, ácido acetilsalicílico y guaifenesina, así como para el producto de degradación habilitado p-aminofenol, con la finalidad de poder implementarlos para la evaluación y mantenimiento de dichas sustancias dentro de Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza.

IV. HIPÓTESIS

Las sustancias son capaces de absorber radiación del espectro debido a sus enlaces covalentes; la ranitidina, indometacina, ácido acetilsalicílico, guaifenesina y p-aminofenol poseen este tipo de enlaces, por lo tanto será posible desarrollar un método por espectrofotometría UV-VIS capaz de cuantificar la pureza de dichas sustancias y que cumpla con los parámetros de desempeño, para así poder utilizarlo como parte de la evaluación de las sustancias de referencia en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Demostrar que los métodos analíticos desarrollados por espectrofotometría UV-VIS cumplen con las aptitudes para determinar la pureza de las sustancias ranitidina, indometacina, ácido acetilsalicílico, guaifenesina y p-aminofenol, a partir de la evaluación de los parámetros de desempeño.

Objetivos particulares

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de las materias primas ranitidina, indometacina, ácido acetilsalicílico, guaifenesina y p-aminofenol para su establecimiento como sustancias de referencia secundarias.
- Demostrar que los métodos analíticos desarrollados cumplen con las aptitudes para determinar la pureza en las sustancias de referencia secundarias a partir de la evaluación de los parámetros de desempeño: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, repetibilidad, robustez y estabilidad analítica.
- Documentar la técnica de los métodos analíticos evaluados en un formato acorde para su implementación en prácticas futuras relacionadas con las sustancias de referencia de los Laboratorio Farmacéutico Zaragoza.

VI. MATERIAL Y EQUIPO

1. Material.

- Agitador magnético
- Anillo de acero
- Bureta de 10 mL
- Cámaras de elución
- Celdas de 1 cm x 1 cm de cuarzo
- Condensador
- Cubre objetos redondo
- Embudo Büchner
- Embudo de separación
- Espátula de acero inoxidable
- Gradilla
- Gradilla para tubos Nessler
- Matraz Kitasato de 250 mL
- Matraces volumétricos de 100, 50, 25 y 10 mL
- Matraz bola de 500 mL
- Papel filtro poro cerrado
- Papel glassine
- Papel parafilm
- Perilla de succión
- Pinza de doble presión
- Pipetas graduadas de 2 y 1 mL
- Pipetas volumétricas de 3 y 1 mL
- Porta objetos
- Probeta 1000, 500 y 10 mL
- Soporte universal
- Tubos capilares
- Tubos de ensayo 13x100
- Tubos Nessler
- Varilla de vidrio

- Vasos de precipitados 1000, 500, 250, 100, 50 y 10 mL
- Vidrio de reloj

2. Instrumentos

- Balanza analítica Marca: Mettler Toledo/Modelo: Classic Light
- Balanza semianalítica Marca: Mettler Toledo/Modelo:PC 2000
- Espectrofotómetro Marca: Hitachi/Modelo:U-2900
- Espectrofotómetro Marca: Perkin-Elmer/Modelo: Lambda-XLSt
- Fisher-Johns Melting Point Apparatus Modelo 4022
- Potenciómetro Marca: Hanna/Modelo:1255C
- Termobalanza Marca: Shimadzu/Modelo: MOC6u
- Termómetro -10 a 250 °C

3. Equipos

- Compact UV Lamp Marca: Entela Certified/Modelo:UVGL-25
- Parrilla de agitación y calentamiento Marca: Thermo Scientific Cimarec/Modelo SP131015
- Recirculador
- Refrigerador Marca:Torrey/Modelo: R-14
- Sonicador Marca: Banelin Sonorex Super/Modelo:1050 CH
- Vortex Marca: Craft Instrumentos.

4. Reactivos (Grado analítico)

a. Sólidos

- Hidróxido de sodio
- Hexamina
- Paracetamol (fármaco)
- Sílica gel
- Sulfato de hidrazina
- Sulfato férrico amónico

b. Líquidos

- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido acético

- Ácido clorhídrico
- Agua destilada
- Cloroformo
- Etanol
- Éter etílico
- Metanol
- Solución amortiguadora pH 4
- Solución amortiguadora pH 7
- Solución amortiguadora pH 10

c. Sustancias de referencia primarias

- Ácido acetilsalicílico. Lote 87C7. Proveedor: COSUFAR.
- Guaifenesina. Lote 31-SSR-74-1. Proveedor:Trc Canadá.
- Indometacina. Lote J16345. Proveedor: USP.
- p-Aminofenol. Lote 1607132. Proveedor:FEUM
- Ranitidina. Lote 60821. Proveedor:FEUM.

d. Sustancias de referencia secundarias

- Ácido acetilsalicílico. Clave interna SR-1
- Ácido salicílico. Clave interna SR-72
- Guaifenesina. Clave interna SR-87
- Indometacina. Clave interna SR-88
- p-Aminofenol Clave interna SR-68
- Ranitidina Clave interna SR-50

5. Soluciones preparadas

- Hidróxido de sodio (0.1 N)
- Hidróxido de sodio (4 N)
- Mezcla binaria etanol: agua destilada (7:3)
- SR de sulfato férrico amónico

Nota: Las soluciones fueron preparadas como se indica en la FEUM 11° edición.

VII. METODOLOGÍA

1. Diagrama de flujo

Con la finalidad de asegurar el cumplimiento de cada uno de los objetivos planteados, se esquematizó el desarrollo del proyecto (Figura 18).

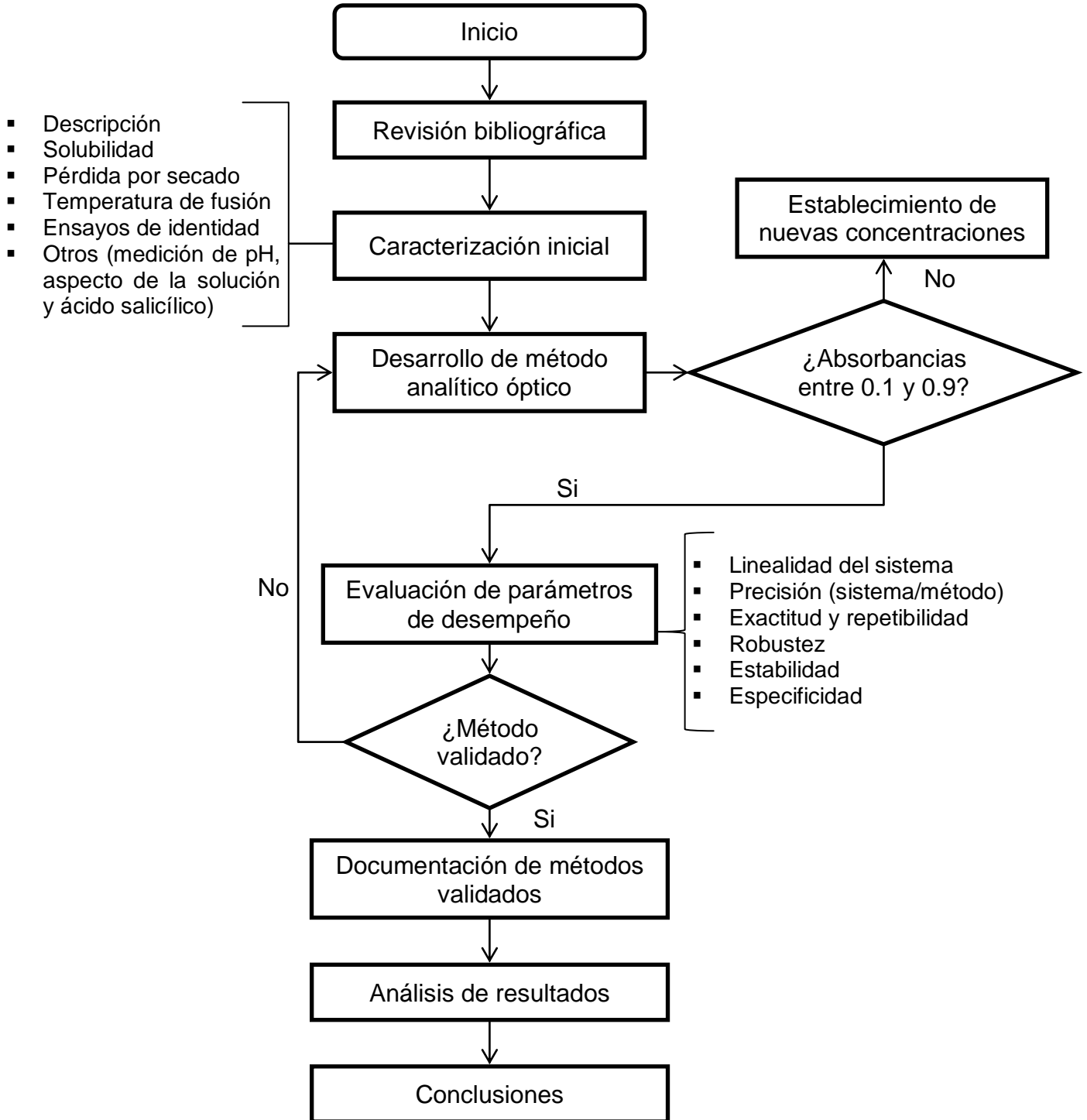


Figura 18. Diagrama de flujo de la metodología correspondiente al proyecto.

2. Procedimiento

2.1 Revisión bibliográfica

Con la finalidad de proporcionarle sustento teórico al proyecto, se consultaron diferentes fuentes de información bibliográficas: libros, artículos científicos, bases de datos, patentes, normas, leyes, guías, entre otros. Una vez reunida la información, se llevó a cabo su síntesis, destacando los aspectos más importantes de cada una de las temáticas a desarrollar.

2.2 Caracterización inicial de las materias primas

La caracterización de las materia primas (ácido acetilsalicílico, indometacina, clorhidrato de ranitidina, guaifenesina y p-aminofenol) se llevó a cabo de acuerdo con los Métodos Generales de Análisis comprendidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Undécima edición. Cabe mencionar que algunos de los métodos fueron adaptados dependiendo de la disponibilidad de reactivos, instrumentos o equipos dentro de las instalaciones de los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza.

a) Descripción

Consistió en la inspección visual de las materias primas; a partir de dichas observaciones se determinaron características físicas como la apariencia y el color.

b) Temperatura de fusión (MGA 0471)

Para este análisis, fue utilizado el aparato Fisher Jonhs. Se tomó una pequeña porción de la sustancia colocándola en un cubreobjetos redondo y a su vez este fue cubierto por otro cubreobjetos de las mismas dimensiones y forma. La muestra preparada se depositó sobre la superficie metálica del aparato para ser sometida a condiciones de aumento de temperatura, regulando esta magnitud constantemente para ejecutar una correcta determinación. Con ayuda de la lupa del aparato, se detectó visualmente el paso de la muestra sólida a un estado líquido, registrando dos lecturas de temperatura (inicial y final).

c) Solubilidad

Se midió el grado de disolución de las materias primas en los disolventes mencionados dentro sus monografías individuales consultadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Undécima edición. A partir de los resultados obtenidos, se determinó el grado de solubilidad de acuerdo con la información que se describe en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Términos asociados al grado de solubilidad de una sustancia.

Términos	Partes de disolvente en volumen requeridas para 1 parte de soluto
Muy soluble	Menos de una parte
Fácilmente soluble	De 1 a 10 partes
Soluble	De 11 a 30 partes
Ligeramente soluble	De 31 a 100 partes
Poco soluble	De 101 a 1000 partes
Muy poco soluble	De 1001 a 10000 partes
Casi insoluble	Más de 10000 partes

d) Ensayos de identidad

Como parte de los ensayos de identidad de las diferentes materias primas, se utilizaron dos métodos en particular, la espectroscopia infrarroja y ultravioleta. Cabe mencionar que algunos métodos fueron implementados, debido a que en la monografía individual de la materia prima no estaban presentes. Este fue el caso del p-aminofenol en ambos ensayos y del ácido acetilsalicílico e indometacina, únicamente para la espectrofotometría UV.

➤ Espectroscopia infrarroja (MGA 0351)

Los espectros de infrarrojo de las materias primas fueron obtenidos con apoyo del Laboratorio de Espectroscopia, cuyas instalaciones se encuentran dentro de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Las muestras se procesaron siguiendo los procedimientos descritos en la monografía individual de la sustancia.

➤ Espectrofotometría ultravioleta (MGA 0361)

Este ensayo consistió en la obtención de los espectros de absorción UV de una muestra problema y una solución estándar para cada una de las materias primas. A continuación se menciona la metodología individual de preparación:

Ácido acetilsalicílico

Para la preparación de la muestra, se pesaron 25 mg de de ácido acetilsalicílico, posteriormente se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se agregaron 12.5 mL de agua destilada y 5 mL de NaOH 1 N. Se agitó y llevó al aforo con agua destilada. A partir de ésta solución, se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL para llevar al aforo empleando NaOH al 0.1 N. La solución estándar se preparó de forma similar, obteniendo en ambos casos una concentración final de 40 µg/mL.

Clorhidrato de ranitidina

Para la preparación de la muestra de clorhidrato de ranitidina, se pesaron 50 mg de la sustancia, transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 100 mL; para llevar a cabo la disolución y el aforo se utilizó agua destilada como disolvente. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de dicha solución y se colocó en un matraz volumétrico de 50 mL para ser aforada con el mismo disolvente previamente utilizado. La concentración final fue 10 µg/mL. La solución estándar se preparó siguiendo el mismo procedimiento aquí descrito.

Indometacina.

Para la preparación de la muestra problema de indometacina, se pesaron 10 mg de la sustancia y se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL; la disolución del sólido y el aforo se realizaron utilizando una mezcla metanol-HCl (9:1) como disolvente. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de dicha solución y se colocó en un matraz volumétrico de 50 mL para ser aforada con el mismo disolvente previamente utilizado. La concentración final obtenida fue 4 µg/mL. La solución estándar de indometacina se preparó siguiendo el mismo procedimiento aquí descrito.

Guaifenesina.

La preparación de la muestra de guaifenesina se llevó a cabo pesando 25 mg de la sustancia, transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 50 mL y utilizando metanol como disolvente, así como para aforar la solución. A continuación, se tomó una alícuota de 1 mL de dicha solución y se transfirió a un segundo matraz de 10 mL. Nuevamente se aforó con metanol. La concentración final de la preparación fue 40 µg/mL. La solución estándar se preparó siguiendo la misma metodología anteriormente descrita.

p-Aminofenol

La preparación de la muestra de p-aminofenol se llevó a cabo pesando 15 mg de la sustancia, transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 50 mL para disolver y aforar utilizando metanol. A continuación, se tomó una alícuota de 2 mL de dicha solución y se transfirió a un segundo matraz de 50 mL. Nuevamente se aforó con metanol. La concentración final de la preparación fue 12 µg/mL. La solución estándar se preparó siguiendo la misma metodología aquí descrita.

e) Pérdida por secado

Se utilizó la termobalanza para ejecutar este análisis. De acuerdo con las indicaciones de uso del instrumento, se colocó de 1 g de la muestra en la charola de aluminio, para posteriormente someterla a calentamiento bajo las condiciones marcadas por el programa 3 (80 °C durante 10 minutos). La cantidad de muestra de p-aminofenol, clorhidrato de ranitidina, indometacina y guaifenesina tuvo que verse disminuida a 0.5 g, debido a la disponibilidad de dichas sustancias.

f) Aspecto de la solución (MGA 0121)

Este método se empleó únicamente para el análisis de la materia prima ácido acetilsalicílico. Se preparó una solución de 1 g de la muestra en 9 mL de alcohol y se transfirió a un tubo Nessler. Posteriormente se colocó el disolvente empleado (etanol) en otro tubo Nessler. Se observaron y compararon ambos líquidos, bajo luz difusa, en plano vertical y sobre un fondo negro, manteniéndose separados entre sí por una distancia de 30 a 50 mm.

g) Ácido salicílico

Este método se empleó únicamente para el análisis del ácido acetilsalicílico. La solución de referencia se preparó a una concentración de 0.1 mg/mL, pesando 10 mg de ácido salicílico en 100 mL de disolvente. Para la muestra, se pesaron 2.5 g y se disolvieron en suficiente alcohol para obtener 25 mL. Por último, se generó una solución de sulfato férrico amónico agregando 1 mL de una solución de HCl 0.1 N a 2 mL de SR sulfato férrico amónico, diluyendo a un volumen de 10 mL. En dos tubos Nessler, se añadió agua destilada (48 mL) y la solución de sulfato férrico (1mL). Finalmente se agregaron ambas soluciones (referencia y muestra), permitiendo la reacción entre los componentes. Transcurridos 30 segundos, se llevó a cabo la comparación visual entre ambos tubos.

h) Medición de pH (MGA 0701)

Este método se empleó únicamente para el análisis del p-aminofenol. Se llevó a cabo la calibración del potenciómetro utilizando soluciones amortiguadoras pH 4, 7 y 10. Posteriormente, se preparó una solución de p-aminofenol al 1%. Tanto la calibración, como la medición del pH de la muestra problema se realizaron a 25 °C, cuidando la limpieza del electrodo al término de cada lectura con agua destilada.

2.3 Síntesis de p-aminofenol

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos de identidad del p-aminofenol SR-68 proveniente del Centro de Recursos Físicos y Servicios (CERFyS), se procedió a sintetizar este compuesto a partir de la hidrólisis básica del paracetamol. A continuación se describe el procedimiento de dicha síntesis:

Se pesaron 44.44 g de paracetamol y se colocaron en un matraz bola de 500 mL. Posteriormente se les agregó 400 mL de una solución de NaOH de concentración 4 N. La reacción se sometió a condiciones de reflujo durante 2 horas. El monitoreo de la reacción se realizó por medio de cromatografía en capa fina utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo (95%) y ácido acético (5%).⁽⁵⁵⁾

Al término de la reacción se llevaron a cabo 3 extracciones líquido-líquido utilizando 100 mL de acetato de etilo para cada una de ellas. Se recolectó la fase orgánica, procediendo con la evaporación del disolvente para promover la cristalización del p-aminofenol. Finalmente se filtró el producto obtenido, haciendo lavados con acetato de etilo frío. Se obtuvieron 200 mg de producto.

2.3.1 Caracterización del p-aminofenol sintetizado

Para la identificación del p-aminofenol, se realizaron los siguientes análisis: cromatografía en capa fina, temperatura de fusión, su solubilidad en metanol y etanol, así como la obtención de su espectro infrarrojo y de absorción UV.

La cromatografía en capa fina se realizó de acuerdo al MGA 0241 utilizando como eluyente acetato de etilo y comparando el producto obtenido con la sustancia de referencia primaria; las aplicaciones se prepararon utilizando etanol como disolvente. Cabe mencionar que también se colocó una aplicación correspondiente al p-aminofenol proveniente del CERFyS.

La preparación de la muestra de p-aminofenol para la obtención de su espectro de absorción se llevó a cabo pesando 10 mg de la sustancia, transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 50 mL para disolver y aforar utilizando metanol. Se tomó una alícuota de 1 mL de la solución anterior para ser transferida a un segundo matraz de 25 mL. Nuevamente se aforó con metanol. La concentración final de la preparación fue 8 µg/mL. La solución estándar se preparó siguiendo la misma metodología descrita.

2.4 Desarrollo y validación de los métodos analíticos por espectrofotometría UV

Una vez concluido el análisis fisicoquímico de las materias primas y determinando su implementación como sustancias de referencia secundarias a través de la evaluación de los resultados obtenidos, se desarrollaron los métodos analíticos para cuantificar su pureza. Para el presente proyecto, se emplearon métodos no farmacopeicos, clasificados a su vez como instrumentales y fisicoquímicos (ópticos, espectrofotométricos).

La solubilidad de las materias primas fue una de las características que se tomó en cuenta para la elección del disolvente a utilizar en la preparación de las muestras. Es importante recalcar que, de igual manera, se consideró la disponibilidad de dichos disolventes dentro de los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza, así como la viabilidad de desarrollar un método con estos en el entendido de que el factor económico también desempeña un papel relevante al momento de implementar una metodología analítica.

Aunado a lo anterior, también se contemplaron los resultados obtenidos a partir de los espectros de absorción realizados como parte de los ensayos de identidad. Posteriormente se hicieron los ajustes pertinentes en cuanto a las concentraciones óptimas para obtener valores de absorbancia que permitieran el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, con la finalidad de evitar las desviaciones de la relación concentración-respuesta debido a valores de absorbancia mayores a 1. Como un rango aceptable de trabajo se marcó el intervalo de absorbancias entre 0.4 y 0.6.

En el caso particular del p-aminofenol, el método desarrollado se aplicó únicamente para el producto sintetizado, ya que se obtuvieron resultados considerados como conformes durante su caracterización inicial.

Una vez que se establecieron los métodos para cuantificar la pureza de las sustancias de referencia secundarias (ver Anexo 6), se procedió a elegir los parámetros de desempeño a evaluar.

La espectrofotometría UV se encuentra incluida en la categoría II I, de acuerdo con lo establecido en la *Clasificación de los métodos analíticos para fines de validación* (ver numeral 5.2). Con base en esto, se consideró que los parámetros a estudiar serían linealidad del sistema, especificidad, precisión (método y sistema), robustez, estabilidad, exactitud y repetibilidad. A continuación se describe la metodología seguida para su evaluación:

2.4.1 Linealidad del sistema

a) Ácido acetilsalicílico

Se preparó una solución stock de ácido acetilsalicílico con una concentración aproximada de 1000 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como disolvente una solución de NaOH 0.1 N. A partir de dicha solución se tomaron alícuotas dependiendo del nivel de concentración deseado empleando una bureta de 10 mL. Éstas se transfirieron a matraces volumétricos de 50 mL, llevando al aforo con el mismo disolvente empleado en la preparación de la solución stock. En el Cuadro 8 se muestra el volumen de las alícuotas tomadas, las concentraciones finales y los niveles de concentración obtenidos.

Cuadro 8. Niveles de concentración, concentración y volumen utilizado para la linealidad del sistema.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen utilizado (mL)
40	8	0.4
60	12	0.6
80	16	0.8
100	20	1
120	24	1.2

Cada uno de los niveles se evaluó por triplicado. La lectura de las muestras en el espectrofotómetro fue a una longitud de onda de 297 nm. Se determinó la relación concentración- respuesta en los 5 niveles de concentración obtenidos.

b) Indometacina

Se preparó una solución stock de indometacina con una concentración aproximada de 200 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como disolvente una mezcla etanol-agua (7:3). A partir de dicha solución se tomaron alícuotas dependiendo del nivel de concentración deseado empleando una bureta de 10 mL. Éstas se transfirieron a matraces volumétricos de 25 mL, llevando al aforo con el mismo disolvente empleado en la preparación de la solución stock. En el Cuadro 9 se muestra el volumen de las alícuotas tomadas, las concentraciones finales y los niveles de concentración obtenidos.

Cuadro 9. Niveles de concentración, concentración y volumen utilizado para la linealidad del sistema.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen utilizado (mL)
40	9.6	1.2
60	14.4	1.8
80	19.2	2.4
100	24	3
120	28.8	3.6

Cada uno de los niveles se evaluó por triplicado utilizando una longitud de onda de 320 nm para la lectura de las muestras en el espectrofotómetro.

c) Guaifenesina

Se preparó una solución stock de guaifenesina con una concentración aproximada de 500 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como disolvente una mezcla etanol-agua (7:3). A partir de dicha solución se tomaron alícuotas dependiendo del nivel de concentración deseado empleando una bureta de 10 mL. Éstas se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL, llevando al aforo con el mismo disolvente empleado en la preparación de la solución stock. El volumen de las alícuotas tomadas, las concentraciones finales y los niveles de concentración obtenidos se desglosan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Niveles de concentración, concentración y volumen utilizado para la linealidad del sistema.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen utilizado (mL)
40	20	0.4
60	30	0.6
80	40	0.8
100	50	1
120	60	1.2

Cada uno de los niveles de concentración se evaluó por triplicado. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 274 nm.

d) Clorhidrato de ranitidina

Se preparó una solución stock de clorhidrato de ranitidina con una concentración aproximada de 250 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como disolvente agua. Con ayuda de una bureta de 10 mL se tomaron alícuotas de esta solución (ver Cuadro 11) y se transfirieron a matraces volumétricos de 25 mL, llevando al aforo con el mismo disolvente empleado en la preparación de la solución stock. Las concentraciones finales y los niveles de concentración obtenidos se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Niveles de concentración, concentración y volumen utilizado para la linealidad del sistema.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen (mL)
40	4	0.4
60	6	0.6
80	8	0.8
100	10	1
120	12	1.2

Cada uno de los niveles se evaluó por triplicado. La lectura de las muestras en el espectrofotómetro fue a una longitud de onda de 313 nm.

e) p-Aminofenol

Se preparó una solución stock de p-aminofenol con una concentración aproximada de 200 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como disolvente una mezcla etanol-agua (7:3). Con ayuda de una bureta de 10 mL se tomaron alícuotas de esta solución (ver Cuadro 12) y se transfirieron a matraces volumétricos de 25 mL, llevando al aforo con el mismo disolvente empleado en la preparación de la solución stock.

Las concentraciones finales y los niveles de concentración obtenidos se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Niveles de concentración, concentración y volumen utilizado para la linealidad del sistema.

Nivel de concentración (%)	Concentración (µg/mL)	Volumen utilizado (mL)
40	3.2	0.4
60	4.8	0.6
80	6.4	0.8
100	8	1
120	9.6	1.2

Cada uno de los niveles de concentración se evaluó por triplicado y la lectura de las muestras en el espectrofotómetro fue a una longitud de onda de 232 nm.

2.4.2 Precisión del sistema

Para cada una de las sustancias se realizó la preparación de 6 muestras a un nivel de concentración del 100% a partir de una solución stock tomando la alícuota correspondiente a dicho nivel y llevando a volumen con su disolvente particular. En el Cuadro 13 se muestra el resumen de las condiciones de preparación de éstas.

Cuadro 13. Condiciones de preparación para cada una de las sustancias de referencia secundarias analizadas a un nivel de concentración del 100%

Sustancia	Disolvente	Concentración (µg/mL)	Longitud de onda (nm)
Ácido acetilsalicílico	NaOH 0.1 N	20	297
Indometacina	Mezcla etanol:agua (7:3)	24	320
Guaifenesina	Mezcla etanol:agua (7:3)	50	274
Clorhidrato de ranitidina	Agua destilada	10	313
p-Aminofenol	Mezcla etanol:agua (7:3)	8	232

2.4.3 Precisión del método

Para determinar la reproducibilidad intralaboratorio del método, dos analistas diferentes prepararon por triplicado soluciones empleando el nivel de concentración central (100%), a partir de una solución stock en dos días diferentes. Las condiciones para cada una de las sustancias se muestran en el Cuadro 13.

2.4.4 Exactitud y repetibilidad

Al tratarse de un fármaco, no se realizó una determinación preparando un placebo cargado y se procedió a preparar por sextuplicado el nivel de concentración correspondiente al 100% para cada sustancia (ver Cuadro 13).

2.4.5 Estabilidad

Se sometieron 6 muestras a estabilidad, generadas a partir de una solución stock con un nivel de concentración del 100% (ver Cuadro 13). Se determinó la concentración inicial de las muestras a la longitud correspondiente, posteriormente se fraccionaron las muestras tubos de ensayo, para su almacenamiento en dos condiciones: Temperatura ambiente (15 a 30 °C) y refrigeración (2 a 8 °C). A las 24 horas transcurridas, nuevamente fueron medidas las absorbancias de las muestras, junto con una solución estándar preparada al instante bajo el mismo nivel de concentración.

2.4.6 Robustez

Para el ensayo de robustez, se utilizaron dos espectrofotómetros diferentes cuyas marcas fueron HITACHI y PERKIN-ELMER. Se prepararon tres muestras y una solución estándar por cada uno de los espectrofotómetros utilizados a un nivel de concentración del 100%, partiendo de una solución stock.

2.4.7 Especificidad

Con el objetivo de determinar la especificidad del método, se hicieron 3 barridos. Uno de ellos correspondiente al disolvente empleado durante el tratamiento de las muestras y los otros dos preparados a partir de la sustancia de referencia primaria y secundaria. Para la preparación de las muestras se utilizó el nivel de concentración del 100%.

VIII. RESULTADOS

A partir de la caracterización inicial de las materias primas y la evaluación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos desarrollados, se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Ácido acetilsalicílico.

1.1 Caracterización inicial

Cuadro 14. Resultados obtenidos de la caracterización del ácido acetilsalicílico.

Prueba	Especificación	Resultado
Descripción.	Polvo blanco cristalino.	Polvo blanco cristalino.
Solubilidad.	Fácilmente soluble en alcohol; soluble en cloroformo y éter dietílico; ligeramente soluble en agua.	Fácilmente soluble en alcohol etílico; soluble en cloroformo y éter etílico; ligeramente soluble en agua.
Temperatura de fusión.	Entre 138 y 140 °C.	151 °C.
Ensayo de identidad*.	A. El espectro IR de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, corresponde con el obtenido con una preparación similar de la S-Ref de ácido acetilsalicílico. B. El espectro UV de una solución de la muestra en NaOH 0.1 N y 1 N, corresponde al obtenido con una preparación similar de la SRef de ácido acetilsalicílico.	A. El espectro IR de la muestra corresponde con el de referencia. B. $\lambda_{\text{Estándar}}=297 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Muestra}}=295 \text{ nm}$
Aspecto de la solución.	La solución es clara.	La solución es clara.
Ácido salicílico.	No más de 0.1%	No más de 0.1%
Pérdida por secado.	No más de 0.5%	0.82%
Valoración**.	Contiene no menos de 99.5% y no más de 100.5% de ácido acetilsalicílico con referencia a la sustancia seca.	100.43% CV=0.96%

* Los espectros IR realizados se encuentran en el Anexo 3 y los espectros UV en el Anexo 2.

**La valoración se llevó a cabo utilizando el método desarrollado y validado.

1.2 Evaluación de los parámetros de desempeño

1.2.1 Linealidad del sistema

Cuadro 15. Linealidad del sistema para la evaluación del ácido acetilsalicílico (datos).

Nivel de concentración (%)	Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia
40	8	0.203
		0.186
		0.185
60	12	0.279
		0.285
		0.281
80	16	0.326
		0.352
		0.357
100	20	0.413
		0.407
		0.429
120	24	0.502
		0.511
		0.482

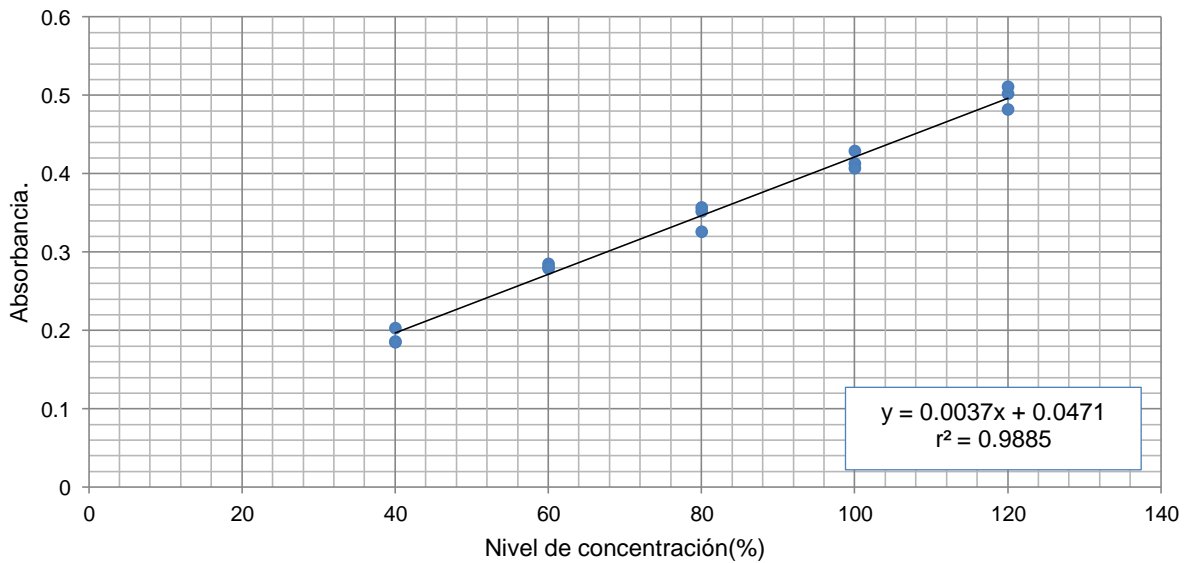


Figura 19. Representación gráfica de la recta de regresión y diagrama de dispersión entre las variables nivel de concentración (%) y absorbancia para el ácido acetilsalicílico.

Cuadro 16. Linealidad del sistema para la evaluación del ácido acetilsalicílico.

Variable independiente	Parámetros		
	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (r^2)	Intervalo de confianza de la pendiente (IC_{β_1})
Nivel de concentración (%)	$y = 0.0037x + 0.0471$	0.9885	$0.003459 \leq \beta_1 \leq 0.004027$
Criterios de aceptación		Dictamen	
$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.		Conforme.	

1.2.2 Precisión del sistema

Cuadro 17. Precisión del sistema para la evaluación de ácido acetilsalicílico.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (absorbancia)
100	20	0.415
		0.406
		0.410
		0.407
		0.398
		0.404
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
$\bar{x} = 0.4067$ C.V.=1.41%	CV \leq 1.5%	Conforme.

1.2.3 Exactitud y repetibilidad del método

Cuadro 18. Exactitud del método para la evaluación del ácido acetilsalicílico.

Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	
0.420	99.63	
0.427	101.50	
0.422	100.16	
0.424	100.69	
0.422	100.16	
0.421	99.89	
Resultados	Criterios de aceptación	Dictamen
I.C(μ)=99.73% $\leq\mu\leq$ 100.95% \bar{x} =100.34 % C.V.=0.67%	IC (μ) debe incluir 100% o \bar{x} (%)=97-103% C.V \leq 3%	Conforme.

1.2.4 Precisión del método

Cuadro 19. Reproducibilidad del método para la evaluación del ácido acetilsalicílico.

	Concentración (%)	
	Analista 1	Analista 2
Día 1	103.37	102.03
	100.96	102.03
	101.23	102.30
\bar{x}	101.85	102.12
C.V	1.29	0.15
Día 2	102.83	100.96
	100.43	103.90
	100.16	102.30
\bar{x}	101.14	102.39
C.V	1.45	1.44
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
\bar{x} =101.87% C.V=1.14%	CV≤3%	Conforme.

1.2.5 Especificidad

Cuadro 20. Especificidad del método para la evaluación ácido acetilsalicílico.

Analito	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Absorbancia
Sustancia de referencia primaria (20µg/mL).	296 (ver Anexo 5)	0.389
Muestra (20µg/mL).	296 (ver Anexo 5)	0.393
Blanco.	369 (ver Anexo 5)	0.010
Resultado	Criterio de aceptación	Dictamen
<ul style="list-style-type: none"> El blanco no presenta máximos a 296 nm. El pico de máxima de absorción de la muestra coincide con el estándar primario. 	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	Conforme.

1.2.6 Estabilidad

Cuadro 21. Estabilidad de muestras de ácido acetilsalicílico almacenadas por 24 horas en condiciones de refrigeración (2°C a 8 °C).

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Refrigeración		
102.83		102.56		
100.43		100.43		
100.16		99.89		
100.69		100.96		
100.16		99.36		
99.89		100.43		
\bar{x}	100.69	\bar{x}	100.61	
C.V	1.07	C.V	1.10	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =0.09%		di ≤ 3%		Conforme.

Cuadro 22. Estabilidad de muestras de ácido acetilsalicílico almacenadas por 24 horas a temperatura ambiente (15 °C a 30°C).

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Temperatura ambiente		
102.83		103.63		
100.43		101.50		
100.16		101.23		
100.69		100.43		
100.16		100.16		
99.89		99.89		
\bar{x}	100.69	\bar{x}	100.14	
C.V	1.07	C.V	1.35	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =0.45%		di ≤ 3 %		Conforme.

1.2.7 Robustez

Cuadro 23. Resultados de la evaluación del ácido acetilsalicílico bajo dos diferentes instrumentos: espectrofotómetro marca HITACHI (A) y espectrofotómetro marca PERKIN-ELMER (B).

Espectrofotómetro			
A		B	
Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)
0.392	99.86	0.383	99.34
0.393	100.11	0.388	100.64
0.391	99.60	0.381	98.82
Resultados		Criterios de aceptación	Dictamen
\bar{X} Espectrofotómetro A=99.86% \bar{X} Espectrofotómetro B= 99.60% $ di =0.25\%$		$ di \leq 3 \%$	Conforme.

1.2.8 Resumen de resultados

Cuadro 24. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados para el ácido acetilsalicílico.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Linealidad del sistema.	$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.	$r^2=0.9885$ IC (β_1)= $0.003459 \leq \beta_1 \leq 0.004027$	Conforme.
Precisión del sistema.	$CV \leq 1.5\%$	1.41%	Conforme.
Precisión del método.	$CV \leq 3\%$	1.13%	Conforme.
Exactitud y repetibilidad.	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%)=97-103\%$ $C.V \leq 3\%$	I.C(μ)= $99.73\% \leq \mu \leq 100.95\%$ $\bar{x}=100.34\%$ $C.V=0.67\%$	Conforme.
Estabilidad.	$ di \leq 3 \%$	$C_R di =0.09\%$ $C_A di =0.44\%$	Conforme.
Robustez.	$ di \leq 3 \%$	$ di =0.25\%$	Conforme.
Especificidad.	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	El método es capaz de cuantificar ácido acetilsalicílico sin mostrar interferencia de otras sustancias.	Conforme.
C_A y C_R = Condiciones a temperatura ambiente y refrigeración respectivamente.			

2. Indometacina

2.1 Caracterización inicial.

Cuadro 25. Resultados obtenidos de la caracterización de la indometacina.

Prueba	Especificación	Resultado
Descripción.	Polvo cristalino blanco a amarillo.	Polvo ligeramente amarillo.
Solubilidad.	Soluble en cloroformo; ligeramente soluble en alcohol, metanol y éter dietílico; casi insoluble en agua.	Soluble en cloroformo; ligeramente soluble en etanol y metanol.
Temperatura de fusión.	Entre 158 y 162 °C.	152 °C.
Ensayo de identidad*.	A. El espectro IR de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, corresponde con el obtenido con una preparación similar de la SRef de indometacina. B. El espectro UV de una solución de la muestra en una mezcla metanol-HCl 0.1 N (9:1), corresponde al obtenido con una preparación similar de la SRef de indometacina.	A. El espectro IR de la muestra corresponde con el de referencia. B. $\lambda_{\text{Estándar}}=317.8 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Muestra}}=319.4 \text{ nm}$
Pérdida por secado.	No más de 0.5%	1.37%
Valoración**.	Contiene no menos de 98.0% y no más de 101.0% de indometacina calculado con referencia a la sustancia seca.	100.09% C.V= 0.48%
* Los espectros IR realizados se encuentran en el Anexo 3 y los espectros UV en el Anexo 2. **La valoración se llevó a cabo utilizando el método desarrollado y validado.		

2.2 Evaluación de los parámetros de desempeño

2.2.1 Linealidad del sistema

Cuadro 26. Linealidad del sistema para la evaluación de la indometacina (datos).

Nivel de concentración (%)	Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia
40	9.6	0.220
		0.219
		0.220
60	14.4	0.311
		0.307
		0.306
80	19.2	0.397
		0.395
		0.393
100	24	0.483
		0.480
		0.479
120	28.8	0.565
		0.566
		0.566

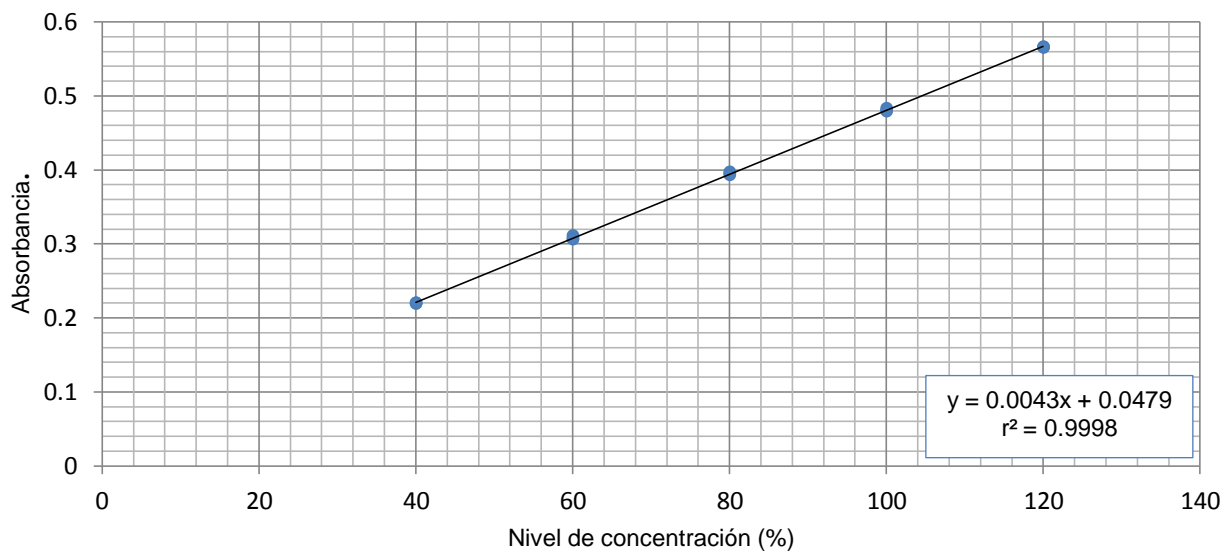


Figura 20. Representación de la recta de regresión y diagrama de dispersión entre las variables nivel de concentración (%) y absorbancia para la indometacina.

Cuadro 27. Linealidad del sistema para la evaluación de la indometacina (resultados obtenidos).

Variable independiente	Parámetros		
	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (r^2)	Intervalo de confianza de la pendiente ($IC\beta_1$)
Nivel de concentración (%)	$y = 0.0043x + 0.0479$	0.9998	$0.00428 \leq \beta_1 \leq 0.004367$
Criterios de aceptación		Dictamen	
$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.		Conforme.	

2.2.2 Precisión del sistema

Cuadro 28. Precisión del sistema para la evaluación de la indometacina.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (absorbancia)
100	24	0.518
		0.521
		0.520
		0.520
		0.519
		0.518
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
$\bar{x} = 0.5193$ C.V.=0.23%	CV \leq 1.5%	Conforme.

2.2.3 Exactitud y repetibilidad

Cuadro 29. Exactitud y repetibilidad del método para la evaluación de la indometacina.

Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	
0.432	98.78	
0.423	98.78	
0.422	99.01	
0.424	98.78	
0.422	98.32	
0.421	99.24	
Resultados	Criterios de aceptación	Dictamen
I.C(μ)= $98.10\% \leq \mu \leq 98.54\%$ $\bar{x} = 98.82\%$ C.V.=0.31%	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%) = 97-103\%$ C.V. \leq 3%	Conforme.

2.2.4 Precisión del método

Cuadro 30. Reproducibilidad del método para la evaluación de la indometacina.

	Concentración (%)	
	Analista 1	Analista 2
Día 1	107.34	108.96
	100.96	102.03
	101.23	102.30
\bar{x}	107.46	108.61
C.V	0.22	0.37
Día 2	108.96	112.66
	108.50	112.20
	108.73	112.66
\bar{x}	108.73	112.51
C.V	1.45	1.44
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
\bar{x} =109.33% C.V=1.85%	CV≤3%	Conforme.

2.2.5 Especificidad

Cuadro 31. Especificidad del método para la evaluación de la indometacina.

Analito	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Absorbancia
Sustancia de referencia primaria (24 µg/mL).	318 (ver Anexo 5)	0.349
Muestra (24 µg/mL).	318 (ver Anexo 5)	0.409
Blanco.	340 (ver Anexo 5)	0.021
Resultado	Criterio de aceptación	Dictamen
<ul style="list-style-type: none"> El blanco no presenta máximos a 318 nm. El pico de máxima de absorción de la muestra coincide con el estándar primario. 	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	Conforme.

2.2.6 Estabilidad

Cuadro 32. Estabilidad de muestras de indometacina almacenadas por 24 horas en condiciones de refrigeración (2°C a 8 °C).

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Refrigeración		
	98.78		98.78	
	98.78		99.01	
	99.01		99.01	
	98.78		98.78	
	98.32		98.78	
	99.24		99.94	
\bar{x}	98.82	\bar{x}	99.05	
C.V	0.31	C.V	0.45	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =0.23%		di ≤ 3%		Conforme.

Cuadro 33. Estabilidad de muestras de indometacina almacenadas por 24 horas a temperatura ambiente (15 °C a 30°C).

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Temperatura ambiente		
	98.78		98.78	
	98.78		99.46	
	99.01		99.71	
	98.78		99.24	
	98.32		99.01	
	99.24		99.94	
\bar{x}	98.82	\bar{x}	99.36	
C.V	0.31	C.V	0.44	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =0.54%		di ≤ 3%		Conforme.

2.2.7 Robustez

Cuadro 34. Resultados de la evaluación de la indometacina por dos diferentes instrumentos: espectrofotómetro marca HITACHI (A) y espectrofotómetro marca PERKIN-ELMER (B).

Espectrofotómetro			
A		B	
Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)
0.447	103.13	0.442	101.74
0.447	103.13	0.447	102.89
0.448	103.36	0.445	102.43
Resultados		Criterios de aceptación	Dictamen
\bar{X} Espectrofotómetro A=103.21% \bar{X} Espectrofotómetro B= 102.36% $ di =0.86\%$		$ di \leq 3 \%$	Conforme.

2.2.8 Resumen de resultados

Cuadro 35. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados para la indometacina.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Linealidad del sistema.	$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.	$r^2=0.9998$ IC (β_1)= $0.00428 \leq \beta_1 \leq 0.004367$	Conforme.
Precisión del sistema.	$CV \leq 1.5\%$	0.23%	Conforme.
Precisión del método.	$CV \leq 3\%$	1.85%	Conforme.
Exactitud y repetibilidad.	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%)=97-103\%$ $C.V \leq 3\%$	I.C(μ)=98.10% $\leq \mu \leq 98.54\%$ $\bar{x}=98.82\%$ $C.V=0.31\%$	Conforme.
Estabilidad.	$ di \leq 3 \%$	$C_R di =0.23\%$ $C_A di =0.54\%$	Conforme.
Robustez.	$ di \leq 3 \%$	$ di =0.86\%$	Conforme.
Especificidad.	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	El método es capaz de cuantificar indometacina sin mostrar interferencia de otras sustancias.	Conforme.
C_A y C_R = Condiciones a temperatura ambiente y refrigeración respectivamente.			

3 Clorhidrato de ranitidina

3.1 Caracterización inicial

Cuadro 36. Resultados obtenidos de la caracterización del clorhidrato de ranitidina.

Prueba	Especificación	Resultado
Descripción.	Polvo cristalino blanco o amarillo claro.	Polvo amarillo claro.
Solubilidad.	Muy soluble en agua; fácilmente soluble en metanol; ligeramente soluble en etanol.	Muy soluble en agua y fácilmente soluble en metanol.
Temperatura de fusión.	Entre 133 y 134 °C.	136°C.
Ensayo de identidad*.	A. El espectro IR de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, corresponde con el obtenido con una preparación similar de la SRef de clorhidrato de ranitidina. B. El espectro UV de una solución de la muestra en agua que contiene 10 µg/mL, corresponde al obtenido con una preparación similar de la SRef de clorhidrato de ranitidina.	A. El espectro IR de la muestra corresponde con el de referencia. B. $\lambda_{\text{Estándar}}=227.8 \text{ nm y } 313.4 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Muestra}}=228 \text{ nm y } 313 \text{ nm}$
Pérdida por secado.	No más de 0.75%	1.51%
Valoración**.	Contiene no menos de 97.5% y no más de 102.0% de clorhidrato de ranitidina calculado con referencia a la sustancia seca.	100.70% C.V=0.91%
* Los espectros IR realizados se encuentran en el Anexo 3 y los espectros UV en el Anexo 2. **La valoración se llevó a cabo utilizando el método desarrollado y validado.		

3.2 Evaluación de los parámetros de desempeño

3.2.1 Linealidad del sistema

Cuadro 37. Linealidad del sistema para la evaluación del clorhidrato de ranitidina (datos).

Nivel de concentración (%)	Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Absorbancia
40	4	0.177
		0.176
		0.175
60	6	0.265
		0.261
		0.270
80	8	0.356
		0.356
		0.352
100	10	0.438
		0.441
		0.446
120	12	0.531
		0.534
		0.532

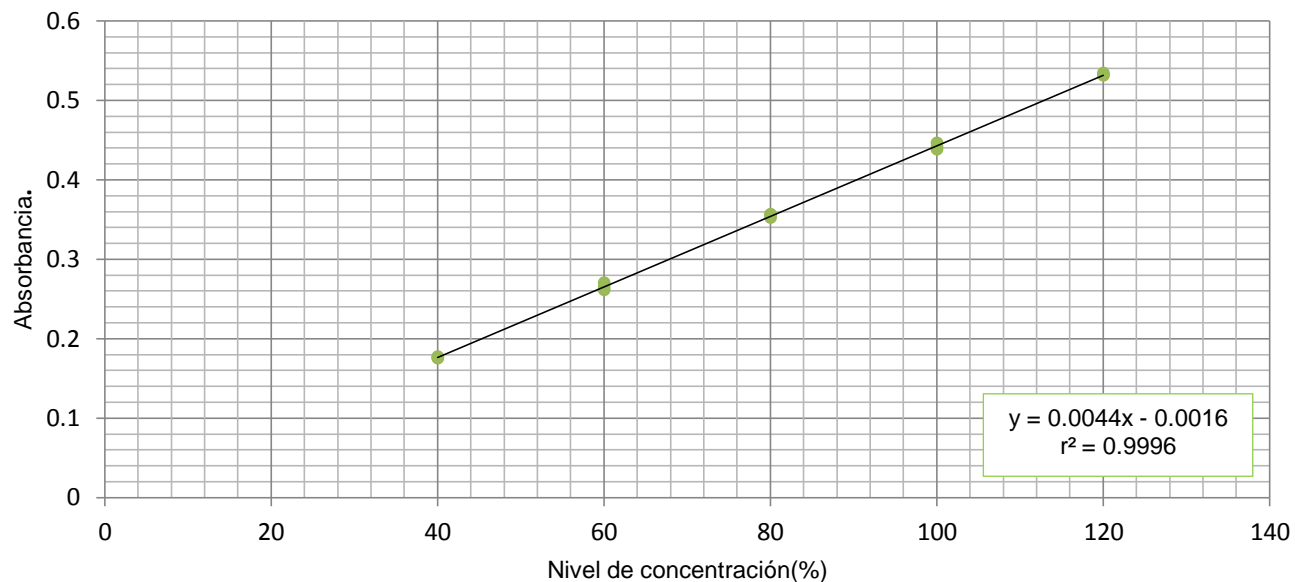


Figura 21. Representación de la recta de regresión y diagrama de dispersión entre las variables nivel de concentración (%) y absorbancia para el clorhidrato de ranitidina.

Cuadro 38. Linealidad del sistema para la evaluación del clorhidrato de ranitidina (resultados obtenidos).

Variable independiente	Parámetros.		
	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (r^2)	Intervalo de confianza de la pendiente (IC_{β_1})
Nivel de concentración (%)	$y = 0.0044x - 0.0016$	0.9996	$0.004382 \leq \beta_1 \leq 0.004508$
Criterios de aceptación		Dictamen	
$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.		Conforme.	

3.2.2 Precisión del sistema

Cuadro 39. Precisión del sistema para la evaluación del clorhidrato de ranitidina.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (absorbancia)
100	10	0.388
		0.394
		0.387
		0.387
		0.392
		0.395
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
$\bar{x} = 0.3905$ C.V.=0.93%	$CV \leq 1.5\%$	Conforme.

3.2.3 Exactitud y repetibilidad

Cuadro 40. Exactitud y repetibilidad del método para la evaluación del clorhidrato de ranitidina.

Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	
0.447	100.92	
0.444	100.23	
0.447	100.92	
0.435	98.23	
0.436	98.45	
0.433	97.77	
Resultados	Criterios de aceptación	Dictamen
I.C(μ)= $98.11\% \leq \mu \leq 100.74\%$ $\bar{x} = 99.42\%$ C.V.=1.44%	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%) = 97-103\%$ C.V. $\leq 3\%$	Conforme.

3.2.4 Precisión del método

Cuadro 41. Reproducibilidad del método para la evaluación del clorhidrato de ranitidina.

	Concentración (%)	
	Analista 1	Analista 2
Día 1	97.32	104.75
	100.96	102.03
	101.23	102.30
\bar{x}	97.02	102.35
C.V	0.75	2.31
Día 2	99.57	103.40
	100.25	104.75
	100.47	100.25
\bar{x}	100.10	102.80
C.V	1.45	1.44
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
\bar{x} =100.57% C.V=2.78%	CV≤3%	Conforme.

3.2.5 Especificidad

Cuadro 42. Especificidad del método para el clorhidrato de ranitidina.

Analito	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Absorbancia
Sustancia de referencia primaria (10 µg/mL).	313 (ver Anexo 5)	0.403
Muestra (10 µg/mL).	312 (ver Anexo 5)	0.447
Blanco.	371 (ver Anexo 5)	0.010
Resultado	Criterio de aceptación	Dictamen
<ul style="list-style-type: none"> El blanco no presenta máximos en el rango de 312-313 nm. El pico de máxima de absorción de la muestra coincide con el estándar primario. 	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	Conforme.

3.2.6 Estabilidad

Cuadro 43. Estabilidad de muestras de clorhidrato de ranitidina almacenadas por 24 horas en condiciones de refrigeración (2°C a 8 °C)

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Refrigeración		
	97.32		97.32	
	97.55		97.55	
	96.20		96.20	
	98.22		98.22	
	98.45		98.22	
	97.77		97.55	
\bar{x}	97.59	\bar{x}	97.51	
C.V	0.82	C.V	0.76	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =0.08%		di ≤ 3%		Conforme.

Cuadro 44. Estabilidad de muestras de clorhidrato de ranitidina almacenadas por 24 horas a temperatura ambiente (15 °C a 30°C).

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Temperatura ambiente		
	97.32		97.32	
	97.55		97.55	
	96.20		96.65	
	98.22		98.45	
	98.45		99.80	
	97.77		99.35	
\bar{x}	97.59	\bar{x}	98.19	
C.V	0.82	C.V	1.25	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =0.60%		di ≤ 3%		Conforme.

3.2.7 Robustez

Cuadro 45. Resultados de la evaluación del clorhidrato de ranitidina bajo dos diferentes instrumentos: espectrofotómetro marca HITACHI (A) y espectrofotómetro marca PERKIN-ELMER (B).

Espectrofotómetro			
A		B	
Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)
0.447	104.20	0.434	103.33
0.446	103.96	0.434	103.33
0.449	104.66	0.439	104.52
Resultados		Criterios de aceptación	Dictamen
\bar{X} Espectrofotómetro A=104.27% \bar{X} Espectrofotómetro B= 103.73% $ di =0.54%$		$ di \leq 3 \%$	Conforme.

3.2.8 Resumen de resultados

Cuadro 46. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados para el clorhidrato de ranitidina.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Linealidad del sistema.	$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.	$r^2=0.9996$ IC (β_1)= $0.004382 \leq \beta_1 \leq 0.004508$	Conforme.
Precisión del sistema.	$CV \leq 1.5\%$	0.93%	Conforme.
Precisión del método.	$CV \leq 3\%$	2.78%	Conforme.
Exactitud y repetibilidad.	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%)=97-103\%$ $C.V \leq 3\%$	$98.11\% \leq \mu \leq 100.74\%$ $\bar{x}(\%)=99.42\%$ $C.V= 1.44\%$	Conforme.
Estabilidad.	$ di \leq 3 \%$	$C_R di =0.08\%$ $C_A di =0.60\%$	Conforme.
Robustez.	$ di \leq 3 \%$	$ di =0.54\%$	Conforme.
Especificidad.	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	El método es capaz de cuantificar el clorhidrato de ranitidina sin mostrar interferencia de otras sustancias.	Conforme.
C_A y C_R = Condiciones a temperatura ambiente y refrigeración respectivamente.			

4 Guaifenesina

4.1 Caracterización inicial

Cuadro 47. Resultados obtenidos de la caracterización de la guaifenesina.

Prueba	Especificación	Resultado
Descripción.	Polvo blanco fino.	Polvo blanco fino.
Solubilidad.	Muy soluble en acetona, metanol; fácilmente soluble en cloroformo, cloruro de metileno y alcohol etílico.	Muy soluble en acetona; fácilmente soluble en alcohol etílico.
Temperatura de fusión.	Entre 78 y 82 °C	77 °C
Ensayo de identidad*.	<p>A. El espectro IR de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, corresponde con el obtenido con una preparación similar de la SRef de guaifenesina.</p> <p>B. El espectro UV de una solución de la muestra en etanol que contiene 50 µg/mL, corresponde al obtenido con una preparación similar de la SRef de guaifenesina.</p>	<p>A. El espectro IR de la muestra corresponde con el de referencia.</p> <p>B. $\lambda_{\text{Estándar}}=272 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Muestra}}=270 \text{ nm}$</p>
Pérdida por secado.	No más de 0.5%	0.59%
Valoración**.	Contiene no menos de 98.0% y no más de 102% de $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ calculado con respecto a la sustancia seca.	99.62% C.V= 0.73%
<p>* Los espectros IR realizados se encuentran en el Anexo 3 y los espectros UV en el Anexo 2. **La valoración se llevó a cabo utilizando el método desarrollado y validado.</p>		

4.2 Evaluación de los parámetros de desempeño

4.2.1 Linealidad del sistema

Cuadro 48. Linealidad del sistema para la evaluación de la guaifenesina (datos).

Nivel de concentración (%)	Concentración($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
40	20	0.250
		0.248
		0.243
60	30	0.349
		0.362
		0.360
80	40	0.488
		0.502
		0.478
100	50	0.615
		0.611
		0.606
120	60	0.731
		0.761
		0.730

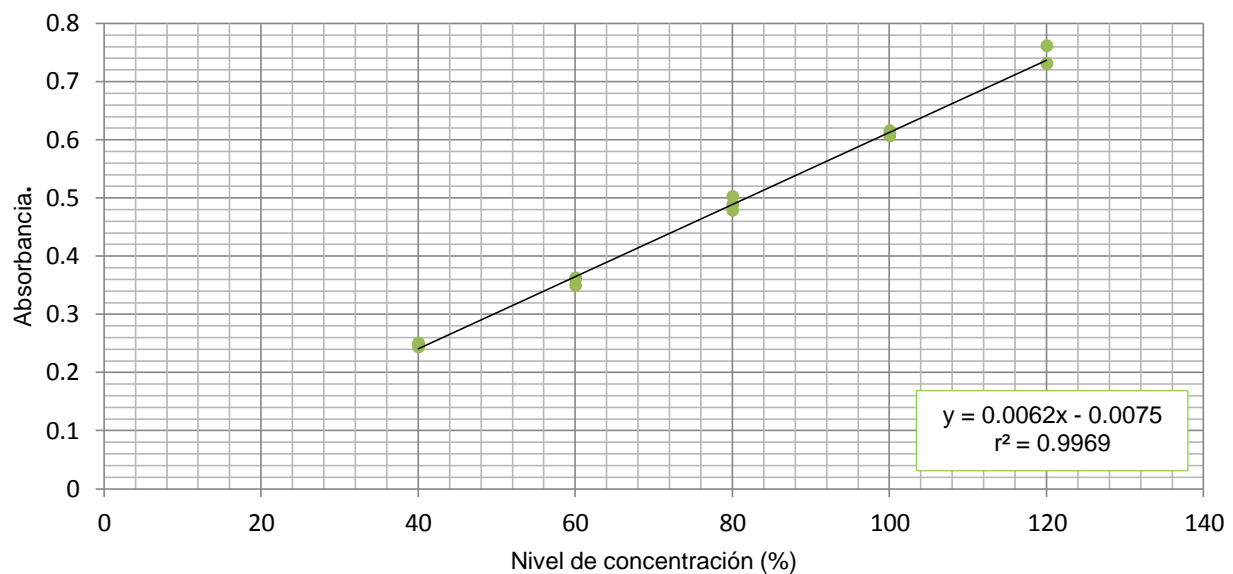


Figura 22. Representación de la recta de regresión y diagrama de dispersión entre las variables nivel de concentración (%) y absorbancia para la guaifenesina.

Cuadro 49. Linealidad del sistema para la evaluación de la guaifenesina (resultados obtenidos).

Variable independiente	Parámetros		
	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (r^2)	Intervalo de confianza de la pendiente (IC_{β_1})
Nivel de concentración (%)	$y = 0.0062x - 0.0075$	0.9969	$0.01192 \leq \beta_1 \leq 0.01290$
Criterios de aceptación		Dictamen	
$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.		Conforme.	

4.2.2 Precisión del sistema

Cuadro 50. Precisión del sistema para la evaluación de la guaifenesina.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (absorbancia)
100	50	0.614
		0.620
		0.609
		0.624
		0.610
		0.619
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
$\bar{x} = 0.620$ C.V.=0.97%	CV \leq 1.5%	Conforme.

4.2.3 Exactitud y reproducibilidad

Cuadro 51. Exactitud y repetibilidad del método para la evaluación de la guaifenesina.

Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	
0.633	103.22	
0.632	103.06	
0.628	102.41	
0.614	100.16	
0.613	99.99	
0.625	101.93	
Resultados	Criterios de aceptación	Dictamen
I.C(μ)=100.50% $\leq \mu \leq$ 103.08% $\bar{x}=101.79\%$ C.V.=1.39%	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%)=97-103\%$ C.V. \leq 3%	Conforme.

4.2.4 Precisión del método

Cuadro 52. Reproducibilidad del método para la evaluación de la guaifenesina.

	Concentración (%)	
	Analista 1	Analista 2
Día 1	103.54	100.16
	100.96	102.03
	101.23	102.30
\bar{x}	103.22	100.48
C.V	1.43	2.26
Día 2	100.48	99.03
	100.48	101.93
	99.83	98.87
\bar{x}	100.26	99.94
C.V	0.37	1.72
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
\bar{x} =100.98% C.V=1.92%	CV≤3%	Conforme.

4.2.5 Especificidad

Cuadro 53. Especificidad del método para la guaifenesina.

Analito	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Absorbancia
Sustancia de referencia primaria (50 µg/mL).	272 (ver Anexo 5)	0.441
Muestra (50 µg/mL).	272 (ver Anexo 5)	0.538
Blanco.	340 (ver Anexo 5)	0.021
Resultado	Criterio de aceptación	Dictamen
<ul style="list-style-type: none"> El blanco no presenta máximos a 272 nm. El pico de máxima de absorción de la muestra coincide con el estándar primario. 	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	Conforme.

4.2.6 Estabilidad

Cuadro 54. Estabilidad de muestras de guaifenesina almacenadas por 24 horas en condiciones de refrigeración (2°C a 8 °C).

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Refrigeración		
100.16		102.90		
101.12		101.12		
99.35		101.28		
101.77		101.45		
99.51		101.28		
100.96		102.73		
\bar{x}	100.48	\bar{x}	101.79	
C.V	0.96	C.V	0.78	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =1.32%		di ≤ 3%		Conforme.

Cuadro 55. Estabilidad de muestras de guaifenesina almacenadas por 24 horas a temperatura ambiente (15 °C a 30°C).

Concentración (%)				
Condiciones iniciales		Temperatura ambiente		
100.16		102.57		
101.12		102.41		
99.35		102.90		
101.77		101.61		
99.51		100.64		
100.96		101.93		
\bar{x}	100.48	\bar{x}	102.01	
C.V	0.96	C.V	0.80	
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen
di =1.53%		di ≤ 3%		Conforme.

4.2.7 Robustez

Cuadro 56. Resultados de la evaluación de la guaifenesina bajo dos diferentes instrumentos: espectrofotómetro marca HITACHI (A) y espectrofotómetro marca PERKIN-ELMER (B).

Espectrofotómetro			
A		B	
Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)
0.627	108.35	0.597	106.84
0.608	105.07	0.588	105.23
0.613	105.93	0.592	105.95
Resultados		Criterios de aceptación	Dictamen
\bar{X} Espectrofotómetro A=106.45% \bar{X} Espectrofotómetro B= 106.01% $ di =0.44%$		$ di \leq 3 \%$	Conforme.

4.2.8 Resumen de resultados

Cuadro 57. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados para la guaifenesina.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Linealidad del sistema.	$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero	$r^2=0.9969$ IC (β_1)= $0.01192 \leq \beta_1 \leq 0.01290$	Conforme.
Precisión del sistema.	$CV \leq 1.5\%$	0.97%	Conforme.
Precisión del método.	$CV \leq 3\%$	1.92%	Conforme.
Exactitud y repetibilidad.	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%)=97-103\%$ $C.V \leq 3\%$	$100.50\% \leq \mu \leq 103.08\%$ $\bar{x}(\%)=101.79\%$ $C.V= 1.39\%$	Conforme.
Estabilidad.	$ di \leq 3 \%$	$C_R di =1.32\%$ $C_A di =1.53\%$	Conforme.
Robustez.	$ di \leq 3 \%$	$ di =0.44\%$	Conforme.
Especificidad.	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	El método es capaz de cuantificar a la guaifenesina sin mostrar interferencia de otras sustancias.	Conforme.
C_A y C_R = Condiciones a temperatura ambiente y refrigeración respectivamente.			

5 p-Aminofenol

5.1 Caracterización inicial

Cuadro 58. Resultados obtenidos de la caracterización del p-aminofenol proveniente del CERFyS y el sintetizado.

Prueba	Especificación	Resultado (SR-68)	Resultado (Sintetizado)
Descripción.	Polvo cristalino blanco o ligeramente coloreado.	Polvo cristalino pardo.	Polvo rojizo.
Solubilidad.	Fácilmente soluble en alcohol; soluble en cloroformo y éter etílico; ligeramente soluble en agua.	Fácilmente soluble en etanol y metanol; soluble en agua.	Fácilmente soluble en etanol y metanol.
Temperatura de fusión.	188-191 °C.	167 °C.	161 °C.
Ensayo de identidad*.	<p>A. El espectro IR de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, corresponde con el obtenido con una preparación similar de la SRef de p-aminofenol.</p> <p>B. El espectro UV de una solución de la muestra en metanol que contiene 12 µg/mL, corresponde al obtenido con una preparación similar de la SRef de p-aminofenol.</p> <p>C. El valor de Rf corresponde al obtenido por el SRef de p-aminofenol empleando como sistema de elución acetato de etilo.</p>	<p>A. El espectro IR de la muestra corresponde con el de referencia.</p> <p>B. $\lambda_{\text{Estándar}}=232 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Muestra}}=222.6 \text{ nm}$</p> <p>C. $Rf_{(SR)}=0.91$ $Rf_{(muestra)}=0.89$</p>	<p>A. El espectro IR de la muestra corresponde con el de referencia.</p> <p>B. $\lambda_{\text{Estándar}}=232 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Muestra}}=232 \text{ nm}$</p> <p>C. $Rf_{(SR)}=0.91$ $Rf_{(muestra)}=0.91$</p>
pH.	3.4 (Solución al 1%)	3.2	NR***
Pérdida por secado.	No más de 0.5%	0.59%	NR***
Valoración**.	Por especificar.	NR***	99.85% C.V= 0.36%

* Los espectros IR realizados se encuentran en el Anexo 3 y los espectros UV en el Anexo 2.
 **La valoración se llevó a cabo utilizando el método desarrollado y validado.
 *** NR= No se realizó.

5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño

5.2.1 Linealidad del sistema

Cuadro 59. Linealidad del sistema para la evaluación del p-aminofenol sintetizado (datos).

Nivel de concentración (%)	Concentración($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
40	3.2	0.162
		0.14
		0.179
60	4.8	0.232
		0.233
		0.235
80	6.4	0.363
		0.334
		0.346
100	8	0.442
		0.439
		0.439
120	9.6	0.524
		0.541
		0.554

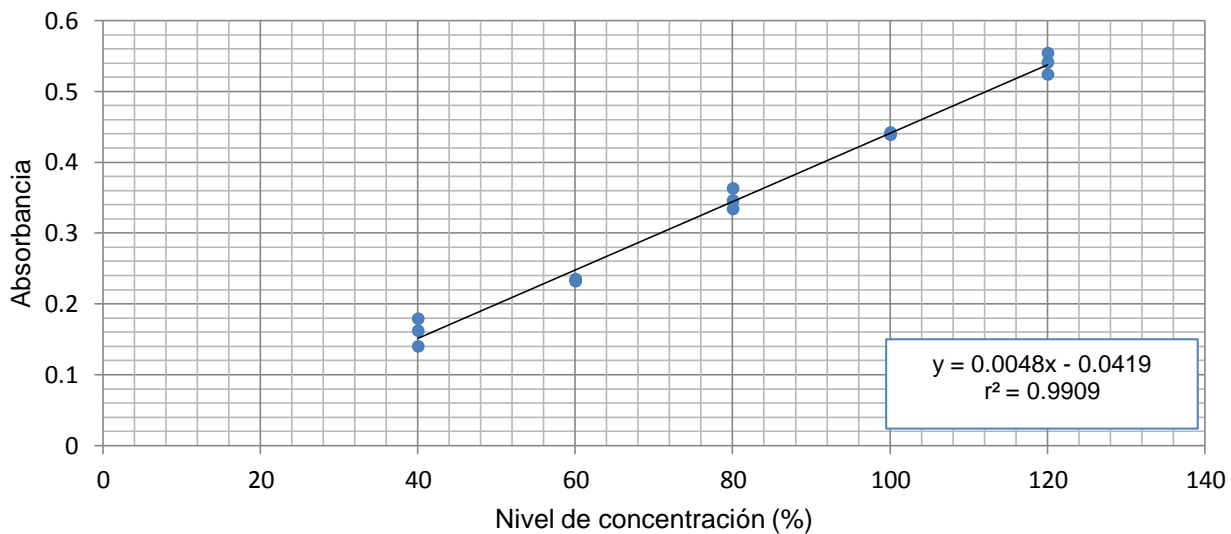


Figura 23. Representación de la recta de regresión y diagrama de dispersión entre las variables nivel de concentración (%) y absorbancia para el p-aminofenol sintetizado.

Cuadro 60. Linealidad del sistema para la evaluación del p-aminofenol sintetizado (resultados obtenidos).

Variable independiente	Parámetros		
	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (r^2)	Intervalo de confianza de la pendiente ($IC\beta_1$)
Nivel de concentración (%)	$y = 0.0048x - 0.0419$	0.9909	$0.004501 \leq \beta_1 \leq 0.005152$
Criterios de aceptación		Dictamen	
$r^2 \geq 0.98$ $IC(\beta_1)$, no debe incluir el cero.		Conforme.	

5.2.2 Precisión del sistema

Cuadro 61. Precisión del sistema para la evaluación del p-aminofenol sintetizado.

Nivel de concentración (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta (absorbancia)
100	8	0.480
		0.474
		0.480
		0.484
		0.477
		0.48
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
$\bar{x} = 0.4792$ $C.V = 0.70\%$	$CV \leq 1.5\%$	Conforme.

5.2.3 Exactitud y repetibilidad

Cuadro 62. Exactitud del método para la evaluación del p-aminofenol sintetizado.

Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	
0.408	100.00	
0.419	102.70	
0.409	100.25	
0.419	102.70	
0.420	102.94	
0.410	100.49	
Resultados	Criterios de aceptación	Dictamen
$I.C(\mu) = 100.23\% \leq \mu \leq 102.79\%$ $\bar{x} = 101.51\%$ $C.V = 1.38\%$	$IC(\mu)$ debe incluir 100% o $\bar{x}(\%) = 97-103\%$ $C.V \leq 3\%$	Conforme.

5.2.4 Precisión del método

Cuadro 63. Reproducibilidad del método para la evaluación del p-aminofenol sintetizado.

	Concentración (%)	
	Analista 1	Analista 2
Día 1	108.14	105.65
	100.96	102.03
	101.23	102.30
\bar{x}	108.76	103.37
C.V	0.57	2.31
Día 2	105.44	105.03
	104.20	107.10
	107.51	108.55
\bar{x}	105.72	106.89
C.V	1.58	1.66
Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
\bar{x} =106.18% C.V=2.52%	CV≤3%	Conforme.

5.2.5 Especificidad

Cuadro 64. Especificidad del método para el p-aminofenol sintetizado.

Analito	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Absorbancia
Sustancia de referencia primaria (8 µg/mL).	232 (ver Anexo 5)	0.801
Muestra (8 µg/mL).	232 (ver Anexo 5)	0.8216
Blanco.	340 (ver Anexo 5)	0.021
Resultado	Criterio de aceptación	Dictamen
<ul style="list-style-type: none"> El blanco no presenta máximos a 232 nm. El pico de máxima de absorción de la muestra coincide con el estándar primario. 	La respuesta del método es únicamente debida al analito.	Conforme.

5.2.6 Estabilidad

Cuadro 65. Estabilidad de muestras de p-aminofenol (sintetizado) almacenadas por 24 horas en condiciones de refrigeración (2°C a 8 °C).

Concentración (%)					
Condiciones iniciales		Refrigeración			
	102.31		100.24		
	103.97		101.48		
	102.93		100.65		
	104.18		102.52		
	102.72		101.27		
	103.97		102.31		
\bar{x}	103.35	\bar{x}	101.41		
C.V	0.76	C.V	0.88		
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen	
di =1.94%		di ≤ 3%		Conforme.	

Cuadro 66. Estabilidad de muestras de p-aminofenol (sintetizado) almacenadas por 24 horas a temperatura ambiente (15 °C a 30°C).

Concentración (%)					
Condiciones iniciales		Temperatura ambiente			
	102.31		102.52		
	103.97		102.10		
	102.93		101.48		
	104.18		103.55		
	102.72		98.99		
	103.97		103.14		
\bar{x}	103.35	\bar{x}	101.96		
C.V	0.76	C.V	1.60		
Resultados		Criterios de aceptación		Dictamen	
di =1.38%		di ≤ 3%		Conforme.	

5.2.7 Robustez

Cuadro 67. Resultados de la evaluación del p-aminofenol sintetizado bajo dos diferentes instrumentos: espectrofotómetro marca HITACHI (A) y espectrofotómetro marca PERKIN-ELMER (B).

Espectrofotómetro			
A		B	
Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)	Respuesta (absorbancia)	Concentración (%)
0.409	100.26	0.438	99.77
0.41	100.49	0.446	101.59
0.412	100.98	0.429	97.72
Resultados		Criterios de aceptación	Dictamen
\bar{X} Espectrofotómetro A=100.57% \bar{X} Espectrofotómetro B= 99.70% $ di =0.88\%$		$ di \leq 3 \%$	Conforme.

5.2.8 Resumen de resultados

Cuadro 68. Resumen de resultados de los parámetros de desempeño evaluados para el p-aminofenol sintetizado.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Linealidad del sistema.	$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero.	$r^2=0.9909$ IC (β_1)= $0.004501 \leq \beta_1 \leq 0.005152$	Conforme.
Precisión del sistema.	$CV \leq 1.5\%$	0.70%	Conforme.
Precisión del método.	$CV \leq 3\%$	2.37%	Conforme.
Exactitud y repetibilidad.	IC (μ) debe incluir 100% o $\bar{x}(\%)=97-103\%$ $C.V \leq 3\%$	$100.23\% \leq \mu \leq 102.79\%$ $\bar{x}(\%)=101.51\%$ $C.V= 1.38\%$	Conforme.
Estabilidad.	$ di \leq 3 \%$	$C_R di =1.94\%$ $C_A di =1.38\%$	Conforme.
Robustez.	$ di \leq 3 \%$	$ di =0.88\%$	Conforme.
Especificidad.	La respuesta del método es únicamente debida al analito	El método es capaz de cuantificar al p-aminofenol sintetizado sin mostrar interferencia de otras sustancias	Conforme.

C_A y C_R = Condiciones a temperatura ambiente y refrigeración respectivamente.

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La habilitación de las materias primas como sustancias de referencia secundaria requirió de su caracterización inicial a través de una serie de pruebas, algunas de ellas destinadas a corroborar la identidad de dichas sustancias como fue el caso de la espectrofotometría IR y UV-Vis, así como la determinación de la temperatura de fusión. Otras pruebas adicionales realizadas fueron la medición de pH en solución, aspecto de la solución y pérdida por secado.

Con respecto a los espectros infrarrojos obtenidos (Anexo 3), el ácido acetilsalicílico analizado presentó señales pertenecientes al grupo carbonilo del éster y ácido carboxílico (1680.92 cm^{-1} y 1748.63 cm^{-1} respectivamente), las cuales coinciden con las obtenidas del estándar primario (1679.85 cm^{-1} y 1749.25 cm^{-1}). La indometacina mostró señales características de los grupos funcionales que ésta posee; el ácido carboxílico se reflejó a 1713.11 cm^{-1} , el enlace C-Cl a 751.74 cm^{-1} y la amida a 1689.39 cm^{-1} , dichos valores también se asemejan en magnitud con el estándar primario (1713.51 cm^{-1} , 751.71 cm^{-1} y 1689.58 cm^{-1}). Para el clorhidrato de ranitidina se focalizó la atención en el grupo nitro (1360.75 cm^{-1} y 1551.37 cm^{-1}), amina (1635.10 cm^{-1}), el compuesto de azufre (758.07 cm^{-1}), así como el grupo éter (1190.66 cm^{-1}) del estándar primario y nuevamente se cotejaron las coincidencias numéricas con el espectro perteneciente a la muestra, confirmando la presencia de los grupos funcionales ya mencionados. En el caso de la guaifenesina, el grupo éter se logró identificar en ambos espectros infrarrojos, ya que se observaron frecuencias que oscilan entre 1020 cm^{-1} y 1075 cm^{-1} al tratarse de un compuesto aromático. En el caso del p-aminofenol SR-68, el espectro infrarrojo perteneciente al estándar primario mostró señales del grupo fenol a 1215.01 cm^{-1} y 1107.04 cm^{-1} , mientras que la materia prima generó señales de 1214.94 cm^{-1} y 1107.19 cm^{-1} , únicamente la señal correspondiente a la amina es ligeramente distinta con respecto a la referencia, ya que esta tuvo una frecuencia de 3242.7 cm^{-1} , mientras que para la muestra problema fue 3360.42 cm^{-1} . De manera generalizada, los espectros infrarrojos pertenecientes a la muestra problema y al estándar de comparación coincidieron en magnitud, por lo tanto se consideró conforme esta prueba para todas las materias primas.

Para la evaluación de los espectros de absorción (Anexo 2), se analizó la presencia de los picos de máxima absorción especificados en la monografía individual de cada materia prima y su comparación con los obtenidos a partir de un estándar primario; en el caso de las partículas de las sustancias que no poseían dicho dato, se emplearon fuentes bibliográficas donde se incluyera esta información. Los espectros UV obtenidos en el caso de las materias primas: indometacina, clorhidrato de ranitidina, ácido acetilsalicílico y la guaifenesina fueron satisfactorios, ya que los valores de longitud de onda de máxima absorción coincidieron numéricamente entre estándar y muestra problema. No obstante, el p-aminofenol proveniente del CERFyS presentó una no conformidad debido a que el valor registrado para el estándar primario fue de 232 nm, mientras que la materia prima mostró un valor de 222.6 nm.

Los aminofenoles son compuestos electroquímicamente muy activos, debido a la presencia de dos grupos que pueden sufrir oxidación, el grupo hidroxilo y el amino; debido a esto, el p-aminofenol es proclive a experimentar este tipo de reacciones y dar paso a la generación de otro compuesto químico llamado p-quinoidina; este compuesto es un intermediario químicamente inestable, por lo cual rápidamente puede ser hidrolizado en medio ácido para dar lugar a la generación de la benzoquinona^(60,61); a su vez, este compuesto comparte una reacción reversible en equilibrio oxidación-reducción con la hidroquinona⁽⁶²⁾. Con base en la información anterior, es posible atribuir la variación en la longitud de onda de máxima absorción a un proceso de degradación oxidativa que pudo haberse suscitado como consecuencia de la exposición prolongada de dicho compuesto con el O₂ atmosférico. De acuerdo con el espectro infrarrojo obtenido, es posible predecir que la degradación afectó directamente al grupo funcional amina y por ello la frecuencia obtenida es ligeramente diferente a lo que proyecta el estándar primario. Como consecuencia de la situación manifestada, se sintetizó p-aminofenol por medio de la hidrólisis básica del paracetamol; el producto resultante fue caracterizado limitadamente debido a que se obtuvo una cantidad considerablemente pequeña. Los resultados obtenidos de dicha caracterización fueron satisfactorios para los ensayos de identidad, ya que se observó que el R_f de la cromatografía en capa fina (Anexo 4), el espectro de absorción y el espectro infrarrojo coincidieron con el estándar de comparación, por lo tanto se confirmó la identidad del producto sintetizado y se pudo

proceder a realizar una cuantificación específica del analito. La apariencia observada y la temperatura de fusión son pruebas que no resultaron conformes a la especificación debido a que el proceso posterior a la síntesis (cristalización y recristalización) no fue optimizado y por ello el p-aminofenol presentó impurezas coloridas que generaron el abatimiento de su temperatura de fusión.

La pérdida por secado sirvió como soporte para valorar si la sustancia requería ser sometida a algún proceso de acondicionamiento previo, considerando que la presencia de materia volátil puede generar el incremento de la humedad durante el almacenamiento y a su vez implicar modificaciones en las propiedades que poseen las materias primas de partida, desencadenando un impacto a futuro en la estabilidad de éstas al momento de habilitarlas como sustancias de referencia secundarias. Se observó que los resultados obtenidos para cada una de las materias primas analizadas son superiores a los marcados por la especificación tomada de su monografía individual. Algunos de los factores que pudieron influir al momento de realizar la prueba son el empleo de cantidades de muestra pequeñas y las condiciones iniciales de la materia prima. Para el primer punto mencionado, hay que hacer énfasis en la sensibilidad del instrumento, la cual se ve afectada por la cantidad de muestra empleada. El manual interno del instrumento sugiere que se coloque de 1 a 2 g, no obstante y debido a la disponibilidad de cada una de las materias primas, se procedió a colocar únicamente 0.5 g; para el caso específico del ácido acetilsalicílico si se empleó la cantidad sugerida. El segundo factor se refiere a la humedad que las sustancias analizadas pudieron adquirir por su exposición con el ambiente, generando así que los valores obtenidos se vieran incrementados.

Como parte del desarrollo de los métodos analíticos, se procuró utilizar volúmenes pequeños de los disolventes al momento de plantear las diluciones, además de implementar mezclas binarias como fue el caso para la indometacina, guaifenesina y el p-aminofenol. Las tres presentan un grado aceptable de solubilidad en etanol, sin embargo el disolvente no podía ser utilizado en su totalidad ya que esto implicaría una demanda considerable en lo que respecta al volumen de uso. Por lo tanto se probó una mezcla con agua, aprovechando la miscibilidad en todas las proporciones entre ambos

disolventes, estableciendo una proporción de 7 partes de etanol por 3 de agua. En el caso particular de la indometacina, para concretar la completa disolución del sólido se tuvo que establecer un tiempo de agitación vigorosa con ayuda de un vórtex durante 10 minutos, debido a que la sustancia se encuentra clasificada como ligeramente soluble en etanol. La disponibilidad del disolvente representó uno de los factores preponderantes para su elección, como ya se mencionó, por lo tanto y bajo esta premisa, el cloroformo no hubiese sido una opción apropiada pese a que la indometacina resulta tener un mayor grado de solubilidad en este.

Para evaluar los parámetros de desempeño de las sustancias de referencia secundarias habilitadas, se utilizaron como criterios de aceptación los descritos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos. En los cuadros 24, 35, 46, 57 y 68 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para cada una de las sustancias habilitadas y se observa que el ácido acetilsalicílico, indometacina, clorhidrato de ranitidina, guaifenesina y el p-aminofenol sintetizado mostraron conformidad en todos los aspectos evaluados. Para éstas sustancias, el método desarrollado fue lineal al calcular un valor de r^2 mayor a 0.98 y un intervalo de confianza para la pendiente en donde no se incluía el cero. Lo anterior refleja que los modelos obtenidos para cada método son capaces de replicar los resultados obtenidos y con ello establecer la proporcionalidad que existe en la interacción de las variables concentración y absorbancia. Tanto el sistema como el método fueron precisos al demostrar que su coeficiente de variación se encuentra debajo del criterio de aceptación (1.5 y 3% respectivamente), por lo tanto es posible afirmar que, en el caso particular del método, este puede generar resultados reproducibles independientemente del cambio de analistas o día para realizar la determinación. Los resultados obtenidos al evaluar la exactitud también están dentro de los límites de aprobación, dado que una de las dos condiciones quedó satisfecha. De manera generalizada, el valor promedio se ubicó dentro del intervalo de 97-103%, no obstante el intervalo de confianza para μ que se estableció para la indometacina, guaifenesina y p-aminofenol no incluía el valor de 100%. Lo anterior sugiere que ese porcentaje podría ser considerado un valor inusual dentro del rango establecido alrededor de la media poblacional. En el caso de la repetibilidad, el coeficiente de

variación fue menor al 3%. Otra de las cualidades que se demostró para el método fue su estabilidad, comprobando la capacidad de las muestras evaluadas de permanecer inalteradas en condiciones de cambios de temperatura (refrigeración/ambiente) o almacenamiento en un lapso de 24 horas. Además se evidenció la robustez del método al evaluar muestras en dos espectrofotómetros de distintas marcas (HITACHI y PERKIN-ELMER), permaneciendo sin cambios significativos ante este cambio pequeño pero deliberado. En el caso de la especificidad representada con espectros de absorción comparativos (Anexo 5), se comprobó que el disolvente empleado en cada uno de los métodos, no mostraba interferencias al momento de ejecutar las lecturas de absorbancias. En este rubro, también se encontró que la señal del analito corresponde con la señal generada por la sustancia de referencia primaria.

Una observación particular en los resultados obtenidos durante la evaluación de los parámetros de desempeño, fueron las concentraciones mayores al 100%. Este efecto se presentó principalmente en la indometacina y específicamente en la determinación de la precisión del método (Cuadro 30). El incremento en dichos valores puede haber sido causado por el disolvente (mezcla binaria etanol-agua), ya que durante su preparación se observó en repetidas ocasiones que su apariencia no era transparente, sino que se contemplaba un aspecto lechoso. Pese a que se demostró que el método no presenta una respuesta debida al disolvente (Cuadro 31), si hubo un incremento en los resultados de absorbancia que se tradujeron en los altos porcentajes de pureza obtenidos. En menor medida se presentó este efecto en el análisis del p-aminofenol sintetizado.

Por último es importante mencionar que los métodos analíticos validados quedaron documentados en el Anexo 6. En dicho anexo se hace la descripción de cada método, incluyendo el material que se empleará y los cálculos necesarios para la obtener la pureza de las sustancias de referencia secundarias.

X. CONCLUSIONES

- Se caracterizaron las materias primas ranitidina, indometacina, ácido acetilsalicílico, guaifenesina y p-aminofenol a partir de la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas.
- Las materias primas evaluadas se habilitaron como sustancias de referencia secundaria, tomando en consideración los resultados obtenidos.
- Se desarrollaron métodos analíticos capaces de cuantificar, por espectrofotometría UV-VIS, la pureza de las sustancias habilitadas. Estos demostraron ser lineales, precisos, exactos, específicos, robustos y estables. Como resultado de lo anterior, se generaron las metodologías para cada uno de ellos.
- Se determinó que los métodos desarrollados son aptos para su futura implementación en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza.

XI. SUGERENCIAS

- Debido a las dificultades que se presentaron al trabajar con el p-aminofenol proveniente del almacén, se recomienda lo siguiente: caracterizar un lote de materia prima proveniente de otra fuente diferente u optimizar el proceso de obtención del p-aminofenol a partir de su ruta sintética.
- Continuar generando metodologías analíticas cuyos parámetros de desempeño sean capaces de determinar la pureza de las sustancias de referencia secundarias que se encuentran en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza.

XII. REFERENCIAS

1. Pharma Insumos. Guía de utilización de Estándares de Referencia Certificados [Libro electrónico]. México: Pharma Insumos eBooks; 2013 [Citado: 08 de junio del 2018]. Disponible en: http://pharmainsumos.com/archivos/phi_ebook_01.pdf
2. International Organization for Standardization. [Página principal en Internet]. ISO Guide 30:2015 Reference materials: Selected terms and definitions. Iso.org; c2015 [actualizado 7 de junio 2018; citado: 7 de junio 2018]; [7 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:46209>
3. Emons H, Fajgelj A, Van der Veen A, Watters R. New definitions on Reference Materials. Accred.Qual.Assur. 2006; Vol 10: 576-578.
4. International Laboratory Accreditation Cooperation ILAC. [Página principal en Internet]. Guidelines for the Competence of Reference Material Producers: ILAC-G12; c2000 [actualizado 6 de julio 2018; citado 7 de julio 2018]; [2 pantallas]. Disponible en: <https://ilac.org/publications-and-resources/ilac-guidance-series/>
5. Bureau International des Poids et Mesures. [Página principal en Internet]. International vocabulary of metrology. Basic and general concepts and associated terms (VIM). Francia: Comité Conjunto para las Guías en Metrología, CJGM;c2012 [actualizado 6 de junio 2018; citado 10 de junio 2018]; [3 pantallas]. Disponible en : <https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>
6. National Institute of Standards and Technology. [Página principal en Internet]. Standard Reference Materials. Estados Unidos: USA.gov; c2015 [actualizado 14 Junio 2017; citado 10 de junio 2018]; [3 pantallas]. Disponible en: <https://www-s.nist.gov/srmors/>
7. Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. Diario Oficial de la Federación. México, 2013.

8. Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11°ed. México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014.
9. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, CIPAM. Guía de sustancias de referencia. 2°ed. México: 2005.
10. Organización Mundial de la Salud: Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas, Serie de Informes Técnicos, No. 885 - Trigésimo quinto informe. Anexo 1: Lista de sustancias químicas de referencia internacional disponibles. Ginebra: ONG Human Info; c1999 [actualizado 05 Julio 2018; citado 07 Julio 2018]; [2 pantallas]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh1790s/16.html#Jh1790s.16>
11. Proyecto de Norma Oficial Mexicana. PROY-NOM-104-SSA1-1994, Que establece el manejo de sustancias químicas de referencia. Diario Oficial de la Federación. México; 1995.
12. FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. [Página principal en Internet]. Sustancias de Referencia. México: LBits.mx; [citado 09 Julio 2018]; [2 pantallas]. Disponible en: <https://farmacopea.org.mx/sref-feum.php?m=4&sb=6&f=0>
13. Organización Mundial de la Salud: Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas, Serie de Informes Técnicos, No. 885 - Trigésimo quinto informe. Anexo 3: Directrices generales para el establecimiento, el mantenimiento y la distribución de sustancias químicas de referencia. Ginebra: ONG Human Info; c1999 [actualizado 10 julio 2017; citado 18 julio 2017]; [2 pantallas]. Disponible en: <http://appswho.int/medicinedocs/es/d/Jh1790s/16.html#Jh1790s.16>
14. The United States Pharmacopoeia 36th. National Formulary 31. Vol. 1, Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, 2013.
15. International Organization for Standardization. ISO Guide 34:2009. General requirements for the competence of reference material producers. 3° ed. Suiza: 2009.
16. International Organization for Standardization. ISO Guide 35:2015. Reference materials: General and statistical principles for certification. 4° ed. Rusia: 2017.
17. Organización Mundial de la Salud: Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 957. Anexo 1: Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Ginebra: ONG Human Info; c2010 [actualizado 10 Julio 2017;

citado 18 Julio 2017]; [2 pantallas]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js18681es/>

18. Organización Mundial de la Salud. Sustancias de referencia y espectros infrarrojos de referencia para análisis farmacopeico. Ginebra: ONG Human Info; c2001 [actualizado 8 agosto 2018; citado 10 agosto 2018]; [2 pantallas]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/66781>

19. Declaratoria de vigencia de las normas mexicanas NMX-CH-100-IMNC-2005, NMX-CH-151-IMNC-2005, NMX-CH-160-IMNC-2006, NMX-CH-161-IMNC-2006, NMX-CH-162-IMNC-2006, NMX-CH-163-IMNC-2006, NMX-CH-164-IMNC-2006, NMX-CH-1119-IMNC-2005, NMX-CH-2538-IMNC-2006, NMX-CH-5725/1-IMNC-2006, NMX-CH-5725/2-IMNC-2006, NMX-CH-7500/1-IMNC-2006, NMX-CH-8512/2-IMNC-2005, NMX-EC-043/1-IMNC-2005 y NMX-EC-043/2-IMNC-2005. Diario Oficial de la Nación DOF, n°9, (13 de abril de 2006).

20. Declaratoria de vigencia de la Norma Mexicana NMX-CH-164-IMNC-2012. Diario Oficial de la Nación DOF, n°16, (22 de marzo de 2013).

21. Declaratoria de vigencia de las normas mexicanas NMX-CH-165-IMNC-2008 y NMX-CH-16269-6-IMNC-2008. Diario Oficial de la Nación DOF, n°2, (2 de abril de 2009).

22. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Diario Oficial de la Federación. México; 2016.

23. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos. Guía de validación de métodos analíticos. México: 2002.

24. International Organization for Standardization. [Página principal en Internet]. ISO Guide 31:2015. Reference materials: Contents of certificates, labels and accompanying documentation.Iso.org; c2015 [actualizado 24 de julio 2018; citado: 24 de julio 2018];[7 pantallas].Disponible en: <https://www.iso.org/standard/52468.html>

25. International Organization for Standardization. [Página principal en Internet]. ISO Guide 33:2015. Reference materials: Good practice in using reference materials Iso.org; c2015 [actualizado 24 de julio 2018; citado: 24 de julio 2018]; [7 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/46212.html>

26. International Organization for Standardization. [Página principal en Internet]. ISO Guide 17034:2016. General requirements for the competence of reference material producers.Iso.org; c2015 [actualizado 24 de julio 2018; citado: 24 de julio 2018]; [7 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/29357.html>
27. International Organization for Standardization. [Página principal en Internet]. ISO Guide 35:2017. Reference materials: Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.Iso.org; c2015 [actualizado 24 de julio 2018; citado: 24 de julio 2018]; [7 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/29357.html>
28. International Organization for Standardization. [Página principal en Internet]. ISO/TR Guide 79:2015. Reference materials: Examples of reference materials for qualitative properties.Iso.org; c2015 [actualizado 24 de julio 2018; citado: 24 de julio 2018]; [7 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/50180.html>
29. International Organization for Standardization. [Página principal en Internet]. ISO Guide 80:2014: Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs).Iso.org; c2015 [actualizado 24 de julio 2018; citado: 24 de julio 2018]; [7 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/44313.html>
30. Ayres G. Análisis químico cuantitativo.2da ed. México: Harla; 1970.
31. Olsen ED. Métodos ópticos de análisis [Libro electrónico]. Barcelona: Editorial Reverté; 1990[Consultado: 17 de agosto de 2018].Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=gtRcq1g4DmYC&printsec=frontcover&dq=metodos+opticos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiywNOInPDcAhVK9YMKHTWEAdwQ6AEIKDAA#v=onepage&q=metodos%20opticos&f=false>
32. Swartz, ME y Krull, IS. Handbook of Analytical Method Validation [Libro electrónico] Boca Raton: CRC Press; 2012 [Consultado: 03 de septiembre de 2018] Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=wK6yRXe_QvUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
33. Organización Mundial de la Salud: Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas, Serie de Informes Técnicos, No.937-Cuadragésimo informe. Anexo 4: Supplementary guidelines on good manufacturing practices: Validation. Ginebra: [ONG Human Info](#); c2006, [actualizado 06

Diciembre 2017; citado 18 Julio 2017]; [2 pantallas]. Disponible en:
<http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js20108en/>

34. Hernández L, González C. Introducción al análisis instrumental [Libro electrónico] España: Ariel Ciencia; 2001 [Consultado: 20 de agosto de 2018] Disponible en:
https://books.google.com.mx/books?id=yVYn7_MoaAIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

35. Gallego A, Garcinuño RM, Morcillo MJ. Experimentación en química analítica [Libro electrónico] Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2013 [Consultado: 17 de agosto de 2018] Disponible en:
https://books.google.com.mx/books?id=6xyP_oVTfolC&printsec=frontcover&vq=m%C3%A9todos+%C3%B3pticos&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=m%C3%A9todos%20%C3%B3pticos&f=false

36. Atkins PW, Jones L. Principios de química: Los caminos del descubrimiento. 3da ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.

37. Del Cura J.L, Pedraza S, Gayete A. Radiología esencial descubrimiento [Libro electrónico] Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2010 [Consultado: 17 de agosto de 2018]. Disponible en:
https://books.google.com.mx/books?id=0CN0Td3J0yUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

38. Callister W.D. Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales descubrimiento [Libro electrónico] Barcelona: Editorial Reverté; 2007 [Consultado: 17 de agosto de 2018]. Disponible en:
<https://books.google.com.mx/books?id=YiWdEYEHBIAC&pg=PA720&dq=radiacion+electromagnetica&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwibn5TzpfXcAhUQOq0KHaoDVoQ6AEIPTAE#v=onepage&q=radiacion%20electromagnetica&f=false>

39. Skoog DA, West D, Holler JH y Crouch S. Química Analítica. 7^a ed. México: Mc Graw-Hill; 2001.

40. Harris D. Análisis químico cuantitativo. 2da ed. España: Editorial Reverté; 2001.

41. Connors, K. Curso Análisis Farmacéutico. 2da ed. España: Editorial Reverté; 1981.

42. Clark BJ, Frost T and Russell MA. UV Spectroscopy Techniques, instrumentation, data handling. London: Chapman & Hall; 1993.

43. Harold HF y Reyes J. Análisis químico e instrumental moderno [Libro electrónico] Barcelona: Editorial Reverté; 2005 [Consultado: 20 de septiembre de 2018]. Disponible en:
https://books.google.com.mx/books?id=htRP2dHJkXgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
44. Magnusson B and Örnemark U, editors. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2da ed. 2014.
45. Draft Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Division of Research. c2015 [citado 05 de septiembre 2018]; [3 pantallas]. Disponible en:
<https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
46. Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2(R1). International Conference on Harmonisation. c1994 [citado 18 febrero 2018]; [2 pantallas]. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>
47. Ermer J, Miller JM and Crowther JH, editors. Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2005.
48. Moffat C, Osselton D and Brian Widdop, editores. Clarke's Analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 2 vol. 4a ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2011.
49. Allen L, editor. Remington: The science and practice of pharmacy. 32va ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2013.
50. Osborne C. and Pack M. Aspirin. 2da ed. Londres: Royal Society of Chemistry; 2003.
51. Sfinder. [Base de datos en Internet]. Columbus, Ohio: American Chemical Society. c 2018. [citado 27 Febrero 2018]. Cas Registry Number 50-78-2, 53-86-1, 66357-59-3, 93-14-1, 123-30-8; [2 pantallas]. Disponible en: <https://scifinder.cas.org>
52. Mörsdorf P, Schickaneder H and Henning K, inventors; Heumann Pharma GmbH and Co, assignee. Process for the preparation of nitroethylene derivatives. EP19870105064. 06 Abril de 1987.

53. Aksenov AV, Lyakhovnenko AS and Kugutov MM. New method for the direct electrophilic amination of aromatic compounds and its use in the annelation of the pyrimidine ring; *Chemistry of Heterocyclic Compounds*.2011;46 (10): 1263-1265.
54. Dibbern HW, Müller RM and Wirbitzki. *Pharmaceutical Substances (UV and IR) and Pharmaceutical and Cosmetic Excipients (IR)*. Aulendorf: Editio Cantor Verlag; 2002.
55. Ayala N. Propuesta para el tratamiento de medicamentos caducos que se acumulan en casa habitación [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ingeniería; 2011.
56. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT. [Página principal en Internet] México: Sistema de Centros Públicos de Investigación; c20018 [Actualizado: 03 de junio 2018; citado 07 de junio de 2018]; [2 pantallas]. Disponible en: <https://centrosconacyt.mx/objeto/metrologia-la-ciencia-de-medir-pesar-y-calibrar/>
57. Ley federal sobre metrología y normalización. Diario Oficial de la Nación DOF, n°1, (01 de junio de 1992).
58. Norma Mexicana. NMX-CH-140-IMNC-2002. Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC). México, diciembre 2002.
59. International Laboratory Accreditation Cooperation ILAC. [Página principal en Internet]. Policy on Traceability of Measurement Results: ILAC-10P; c2013 [actualizado 6 de julio 2018; citado 7 de julio 2018]; [2 pantallas]. Disponible en: <https://ilac.org/publications-and-resources/ilac-policy-series/>
60. Snead W and Remick E. Studies on Oxidation-Reduction Mechanism. II. The Anodic Oxidation of p-Aminophenol. *Journal of the American Chemical Society*. 1957; 79 (23), 6121-6127.
61. Florey Klaus. *Analytical profiles of drug substances*. 1° ed. Estados Unidos: American Press; 1974.
62. Weininger S y Stermitz F. *Química orgánica*. 1° ed. España: Editorial Reverté; 1988.

XIII. ANEXOS

Anexo 1: Glosario de conceptos básicos de metrología

5.1 Metrología

Ciencia que se ocupa de las mediciones, unidades de medida y de los equipos utilizados para efectuarlas, así como de su verificación y calibración periódica. ⁽⁵⁶⁾

2. Medición

Acto de determinar el valor de una magnitud. ⁽⁵⁷⁾

3. Magnitud

Propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia, siendo esta última una unidad de medida, procedimiento de medida, material de referencia o una combinación de ellos. ⁽⁵⁾

4. Patrón de medida

Es la medida materializada, el instrumento o sistema de medición que se utiliza para la definición, conservación o reproducción de uno o varios valores; es decir que se usa como referencia. Este tendrá un valor determinado y una incertidumbre de medida asociada. ^(1,5)

5. Incertidumbre

Parámetro que caracteriza la dispersión de los resultados asociados un proceso de medición y que podría atribuirse razonablemente al mesurado. ^(5,58)

6. Trazabilidad metrológica

Propiedad que posee un resultado, obtenido a partir de un proceso de medición, para relacionarse con referencias establecidas como aceptables por estándares internacionales o nacionales, mediante una cadena ininterrumpida y documentada de comparaciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida. ^(5,59)

Anexo 2: Espectros de absorción de las materias primas como ensayo de identidad

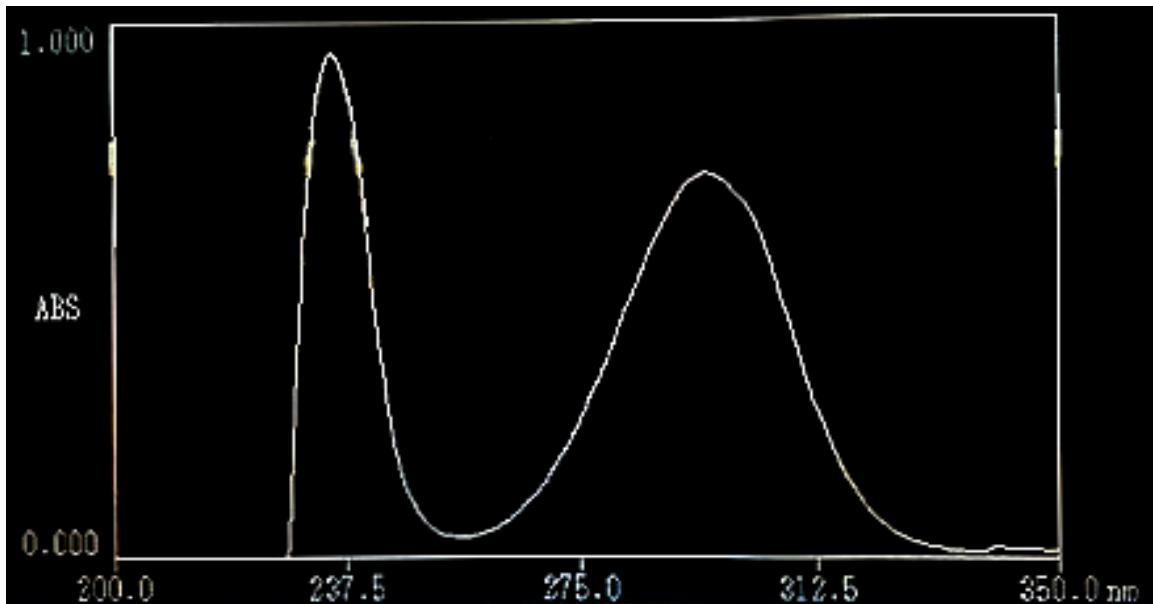


Figura 24. Espectro UV del estándar primario de ácido acetilsalicílico a una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ utilizando NaOH 1 N y 0.1 N como disolvente.

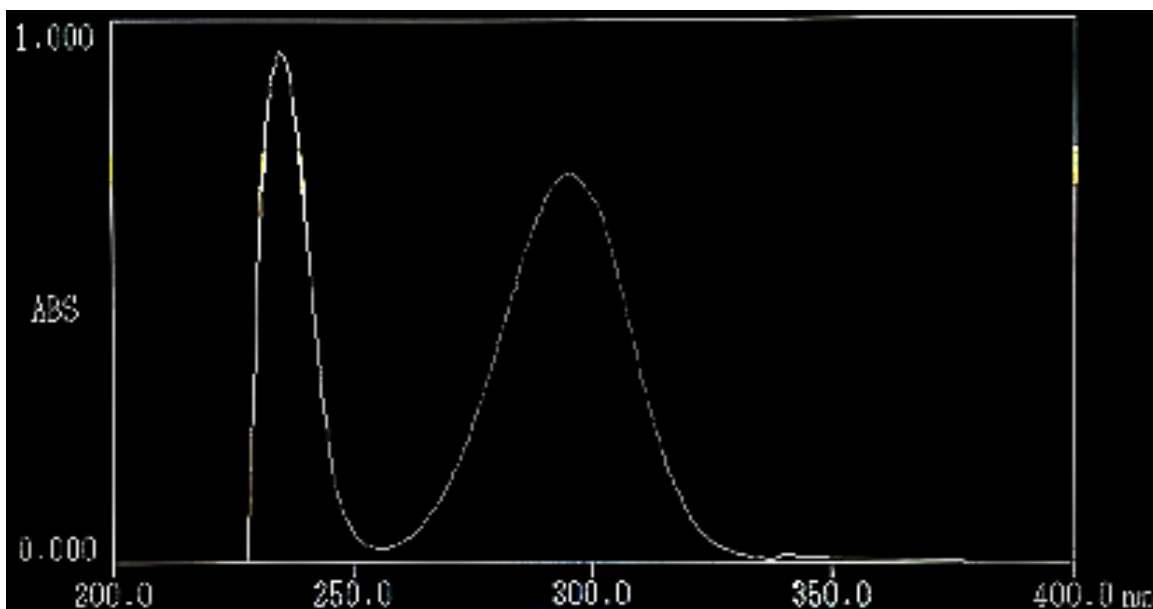


Figura 25. Espectro UV de la muestra de ácido acetilsalicílico a una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ utilizando NaOH 1 N y 0.1 N como disolvente.

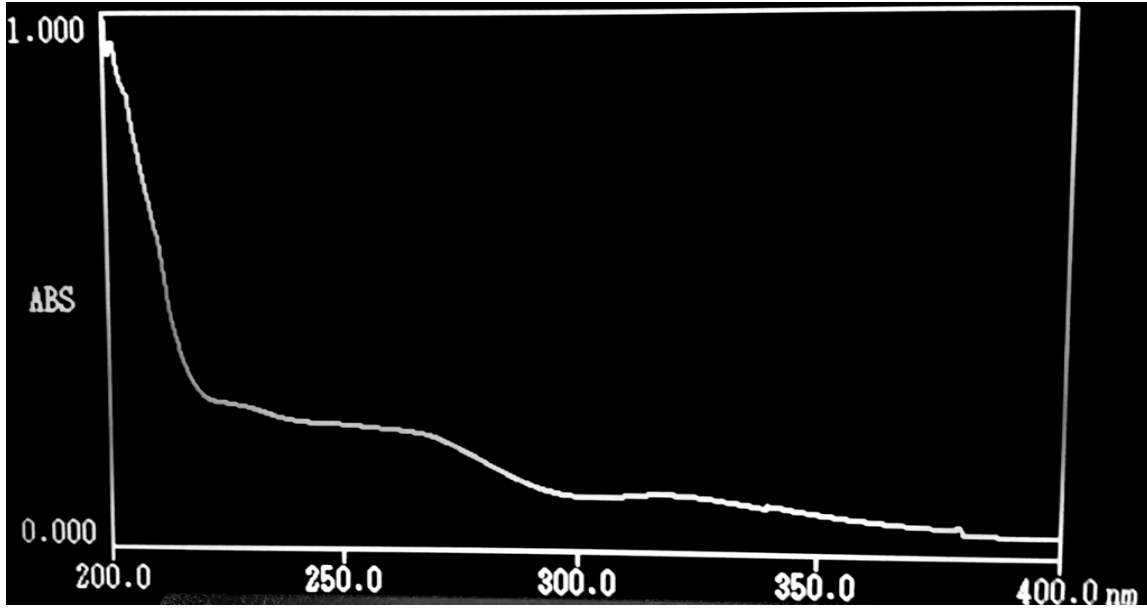


Figura 26. Espectro UV del estándar primario de indometacina a una concentración de 4 µg/mL utilizando una mezcla metanol-HCl (9:1) como disolvente.

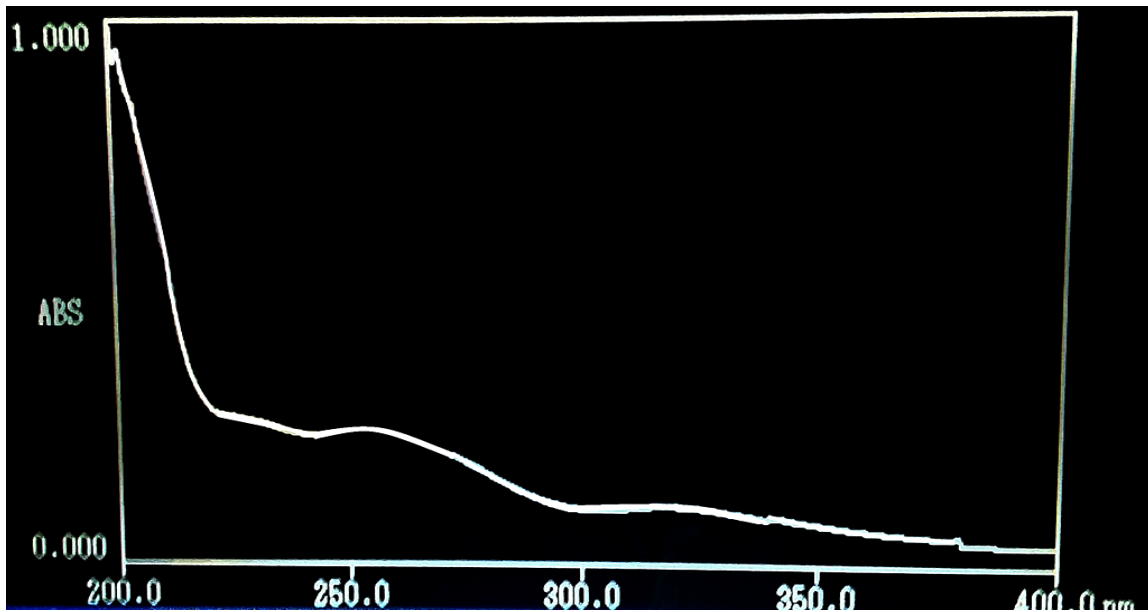


Figura 27. Espectro UV de la muestra de indometacina a una concentración de 4 µg/mL utilizando una mezcla metanol-HCl (9:1) como disolvente.

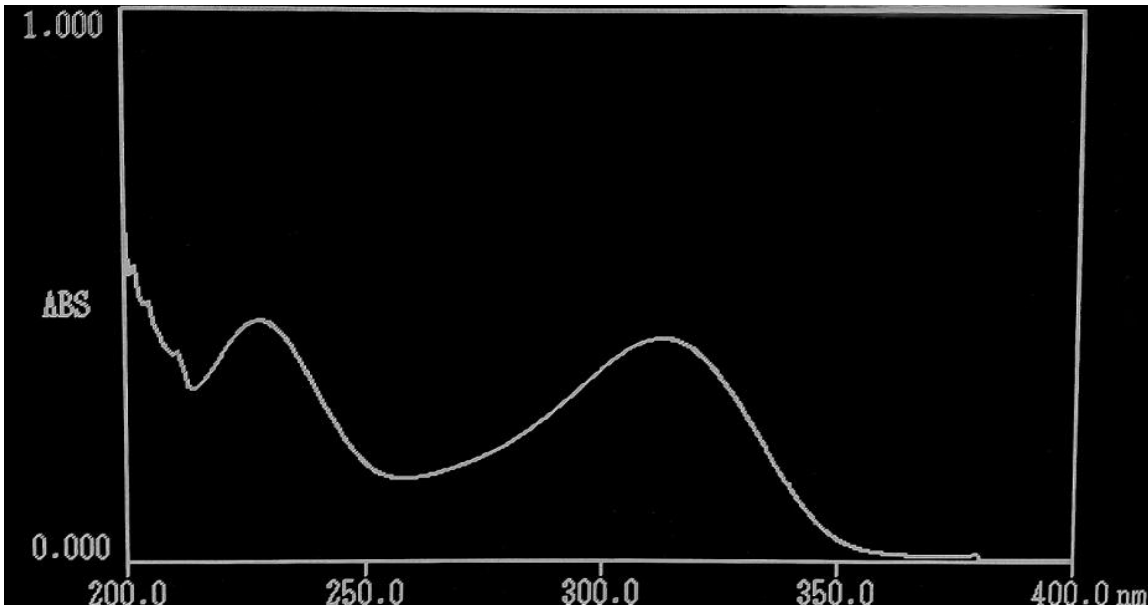


Figura 28. Espectro UV del estándar primario de clorhidrato de ranitidina a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ utilizando agua destilada como disolvente.

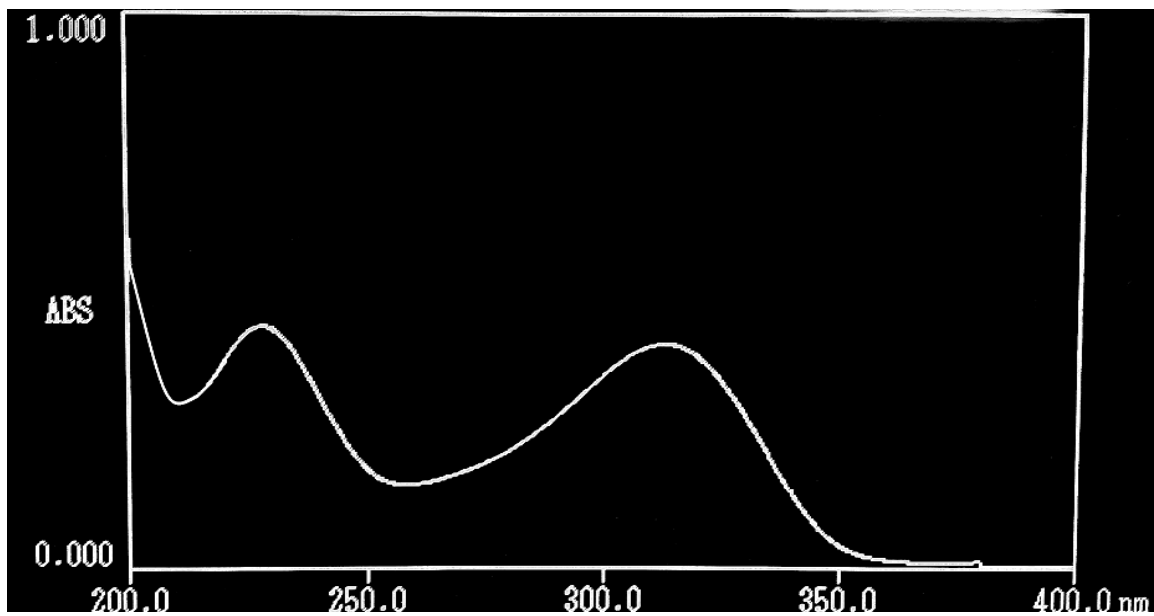


Figura 29. Espectro UV de la muestra de clorhidrato de ranitidina a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ utilizando agua destilada como disolvente.

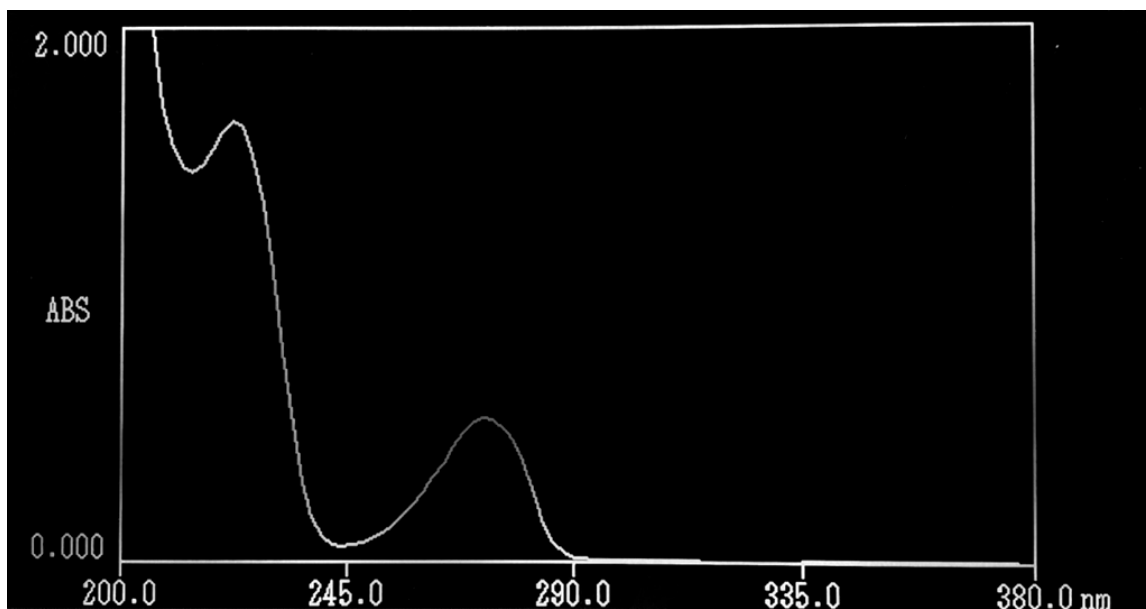


Figura 30. Espectro UV del estándar primario de guaifenesina a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ utilizando etanol como disolvente.

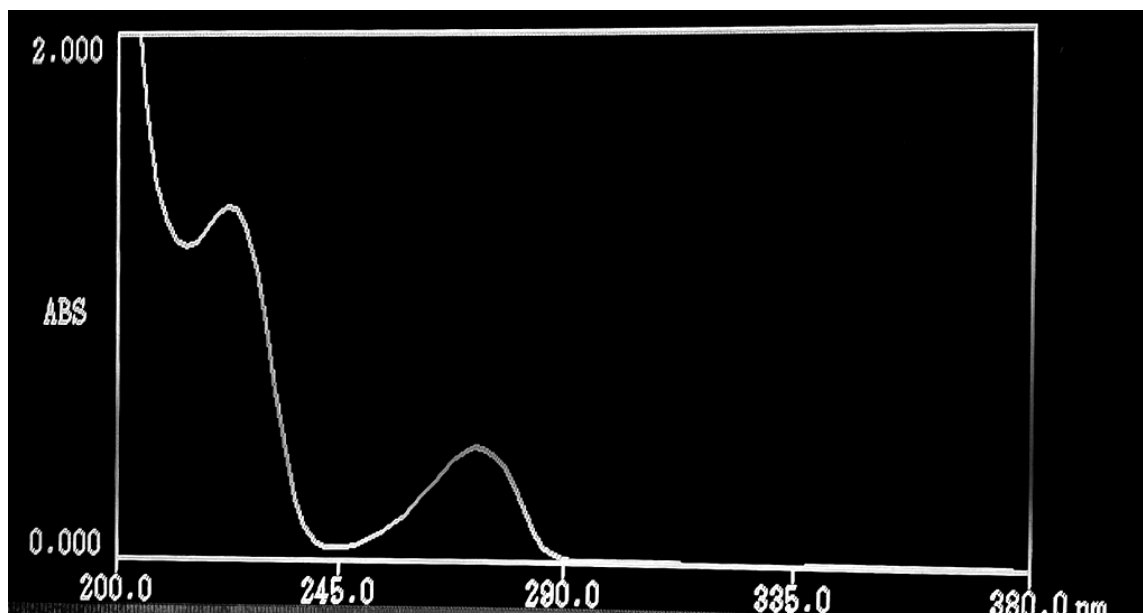


Figura 31. Espectro UV de la muestra de guaifenesina a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ utilizando etanol como disolvente.

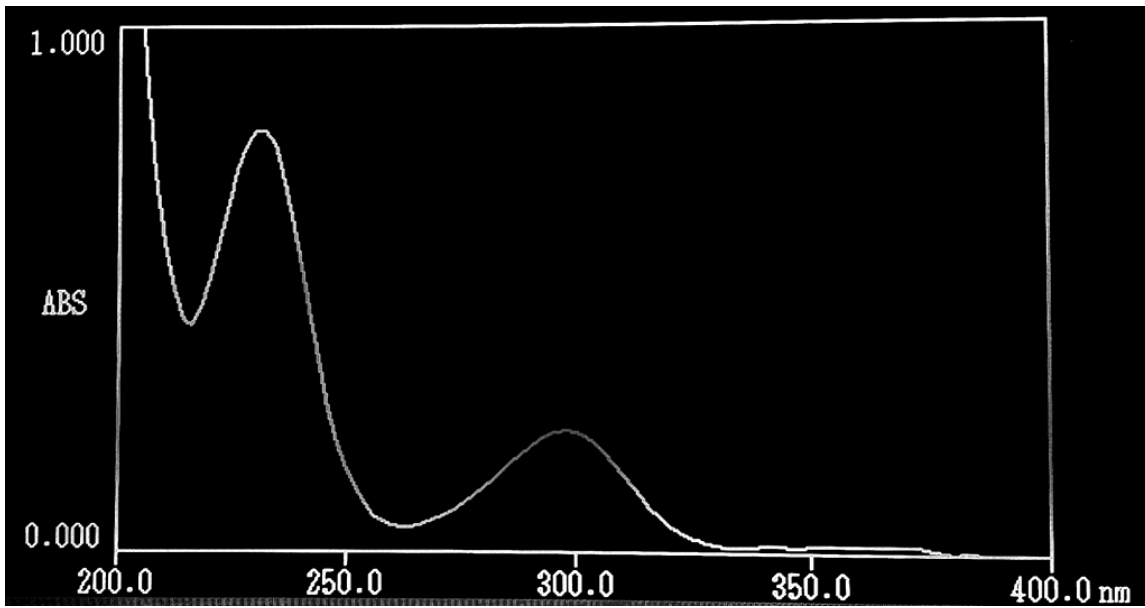


Figura 32. Espectro UV del estándar primario de p-aminofenol a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$ utilizando metanol como disolvente.

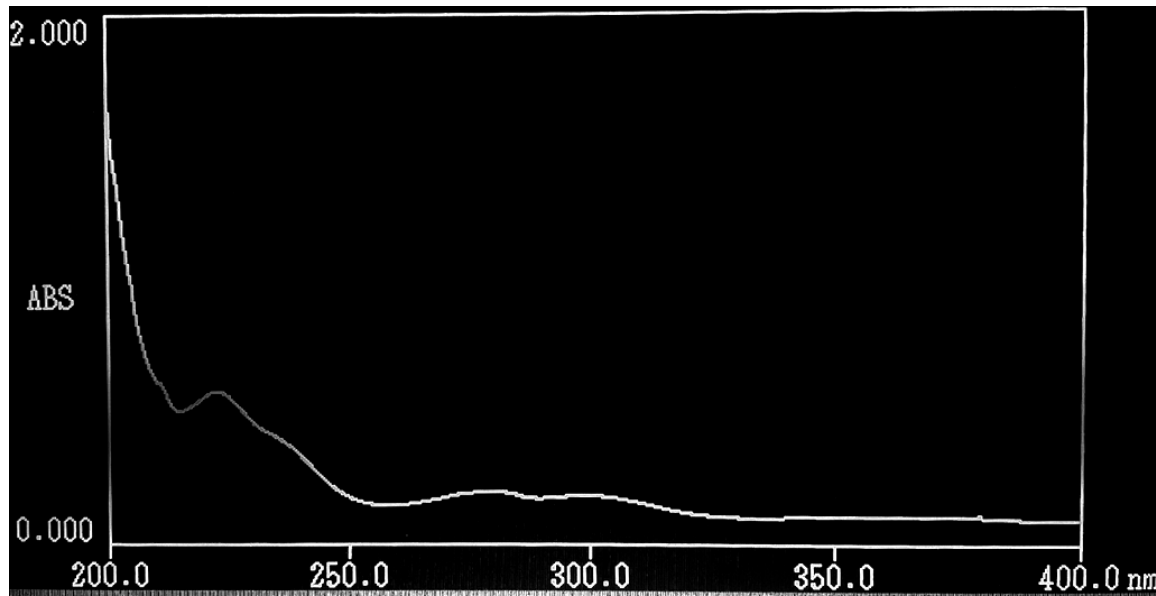


Figura 33. Espectro UV de la muestra de p-aminofenol a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$ utilizando metanol como disolvente.

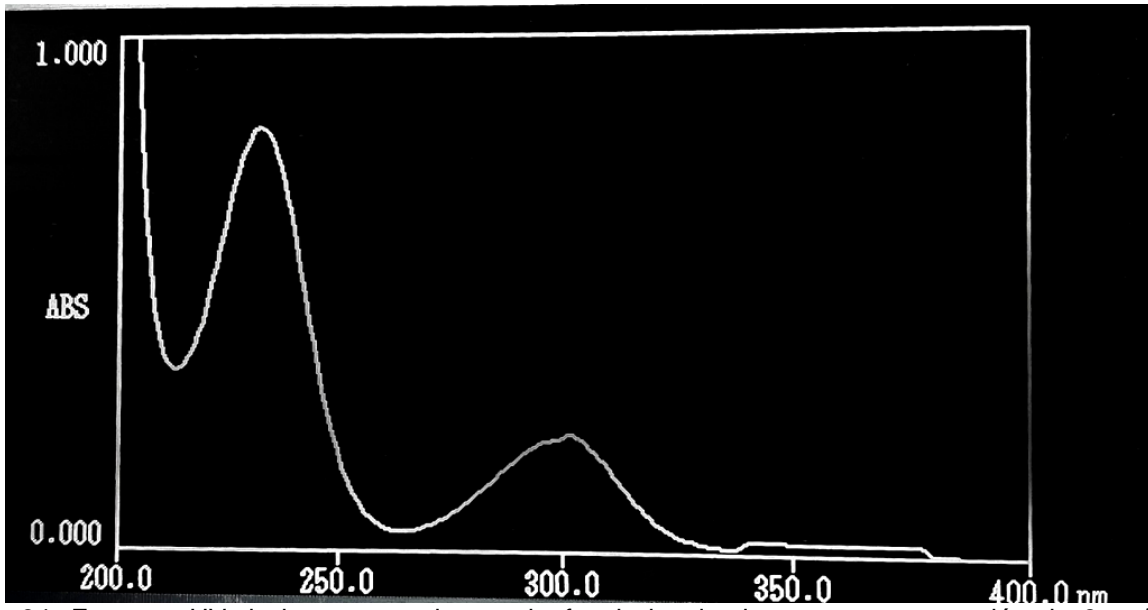


Figura 34. Espectro UV de la muestra de p-aminofenol sintetizado a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando metanol como disolvente.

Anexo 3: Espectros infrarrojo de las materias primas como ensayo de identidad

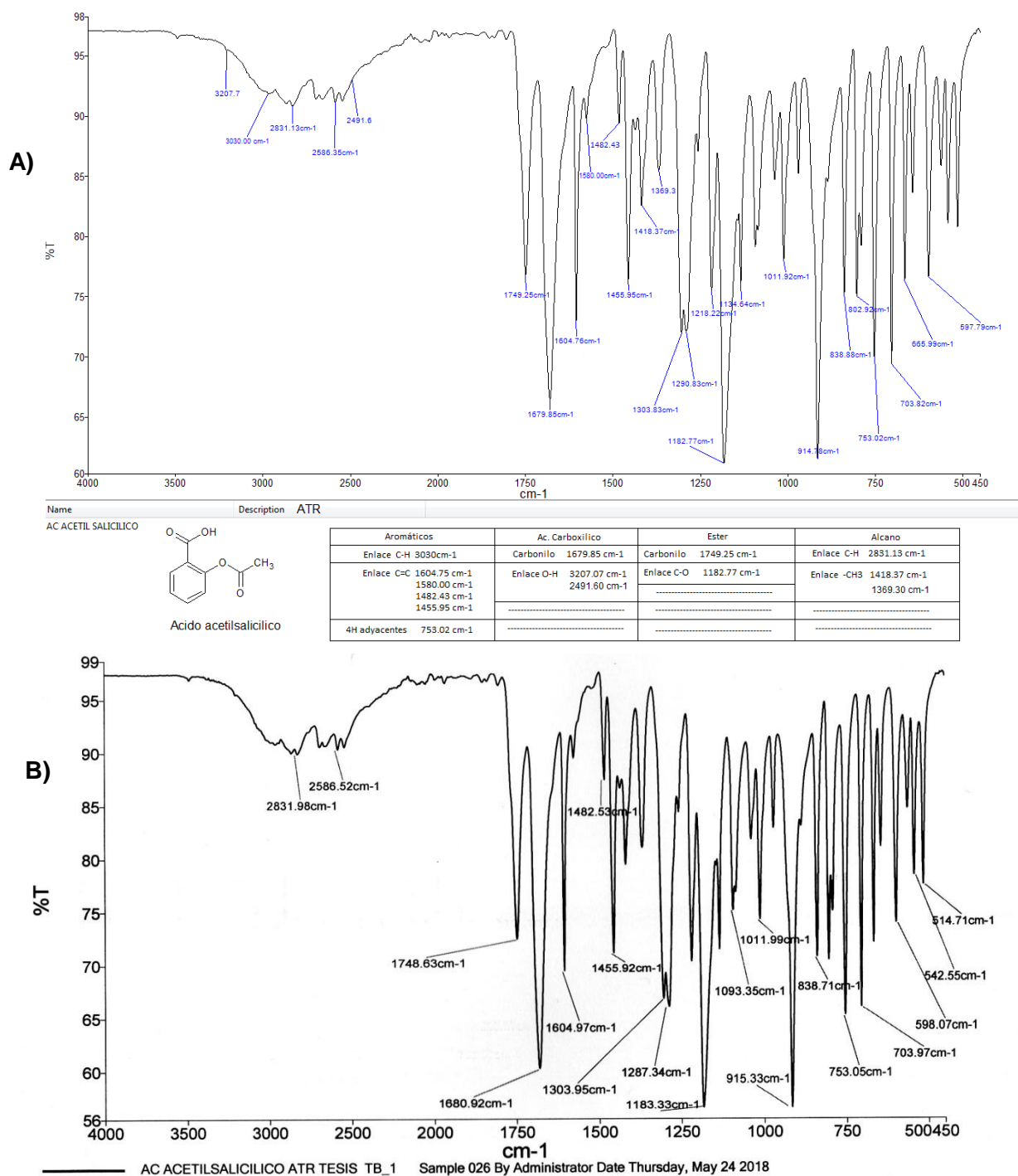
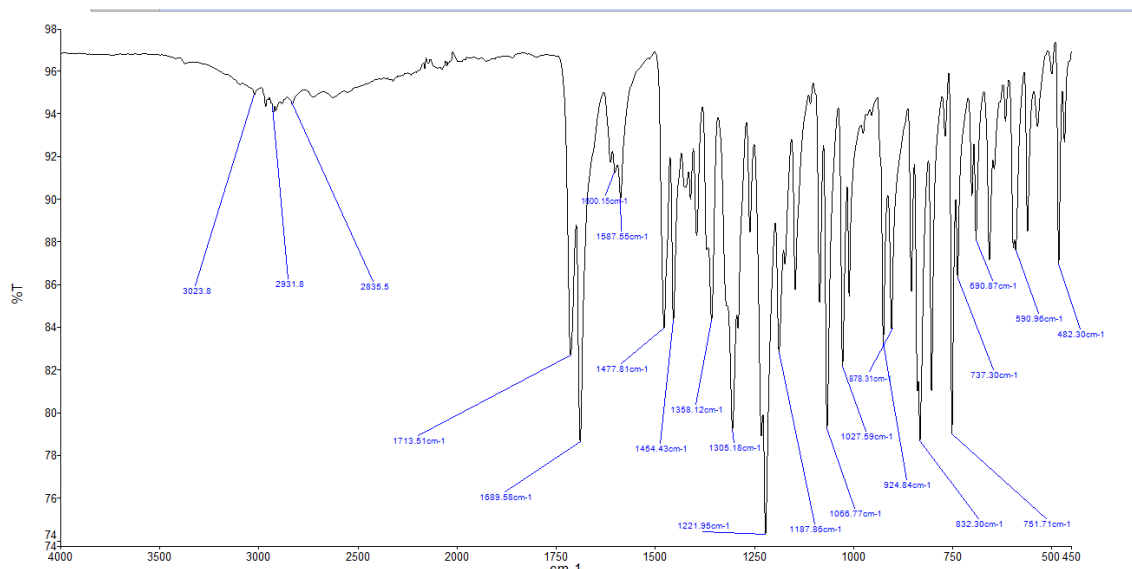
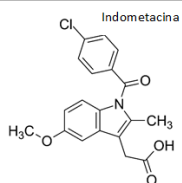


Figura 35. Espectro infrarrojo del ácido acetilsalicílico. A) Sustancia de referencia primaria. B) Sustancia de referencia secundaria.

A)

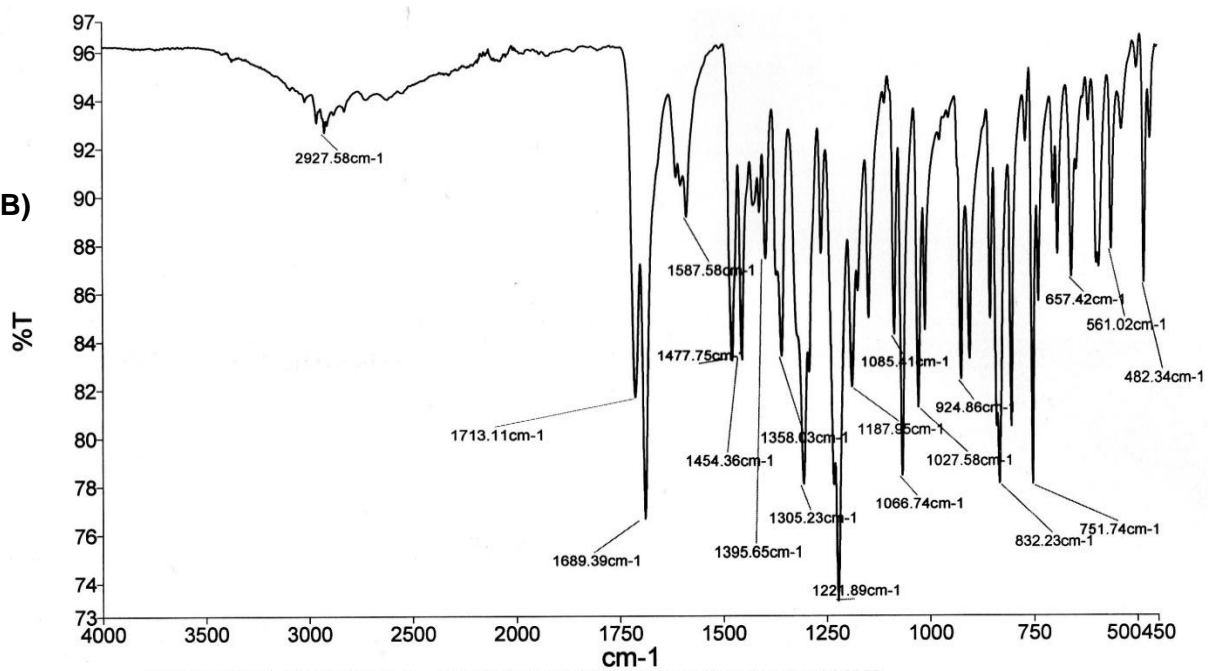


Name	Description
INDOMETACINA ATR_1	Sample 024 By Administrator Date Tuesday,...



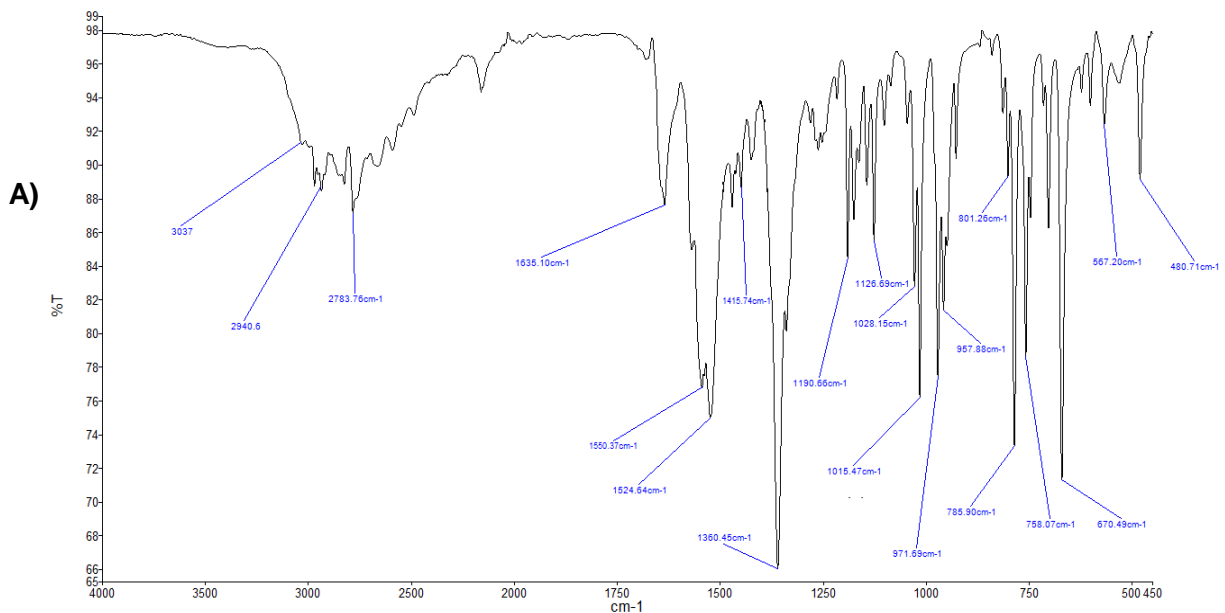
Aromatico	Ac. Carboxilico	Amida	Alcano
Enlace C-H 3023.80 cm-1	Enlace C=O 1713.51 cm-1	Enlace C=O 1689.58 cm-1	Enlace C-H 2931.80 cm-1
Enlace C=C 1600.15 cm-1 1687.55 cm-1 1454.43 cm-1			Enlace -CH3 1477.81 cm-1 1358.12 cm-1
1 H adyacentes 878.31 cm-1			
2 H adyacentes 832.30 cm-1			
Enlace C-Cl 751.71 cm-1			

B)

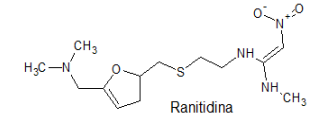


INDOMETACINA ATR TESIS TB_1 Sample 024 By Administrator Date Thursday, May 24 2018

Figura 36. Espectro infrarrojo de la indometacina. A) Sustancia de referencia primaria. B) Sustancia de referencia secundaria.



Name	Description
RANITIDINA ATR_001_1	Sample 010 By Administrator Date Friday, ...



Amina	Eter	Compuesto de azufre	Nitro
Enlace N-H 3037.00cm-1 1635.10 cm-1	Enlace C-O 1190.66 cm-1	Enlace S-C 758.07 cm-1	Enlace C-NO2 1550.37 cm-1 1360.45 cm-1
Enlace C-N 1015.47 cm-1 1415.74 cm-1			

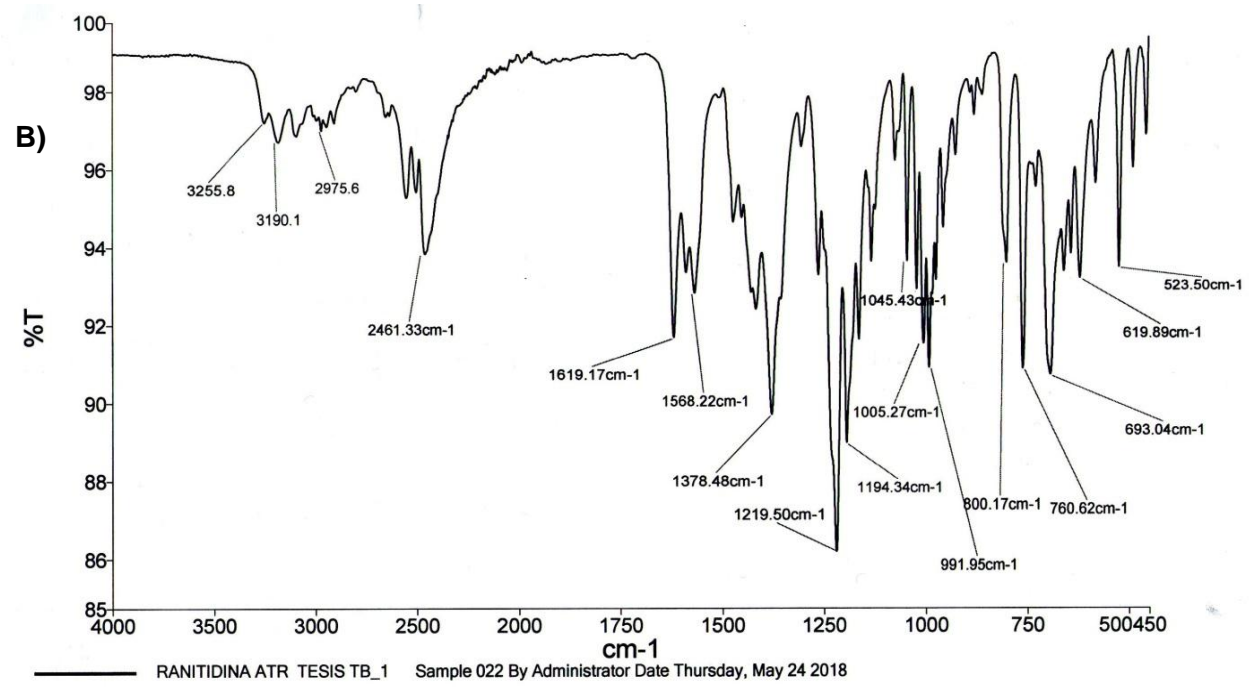


Figura 37. Espectro infrarrojo del clorhidrato de ranitidina. A) Sustancia de referencia primaria. B) Sustancia de referencia secundaria.

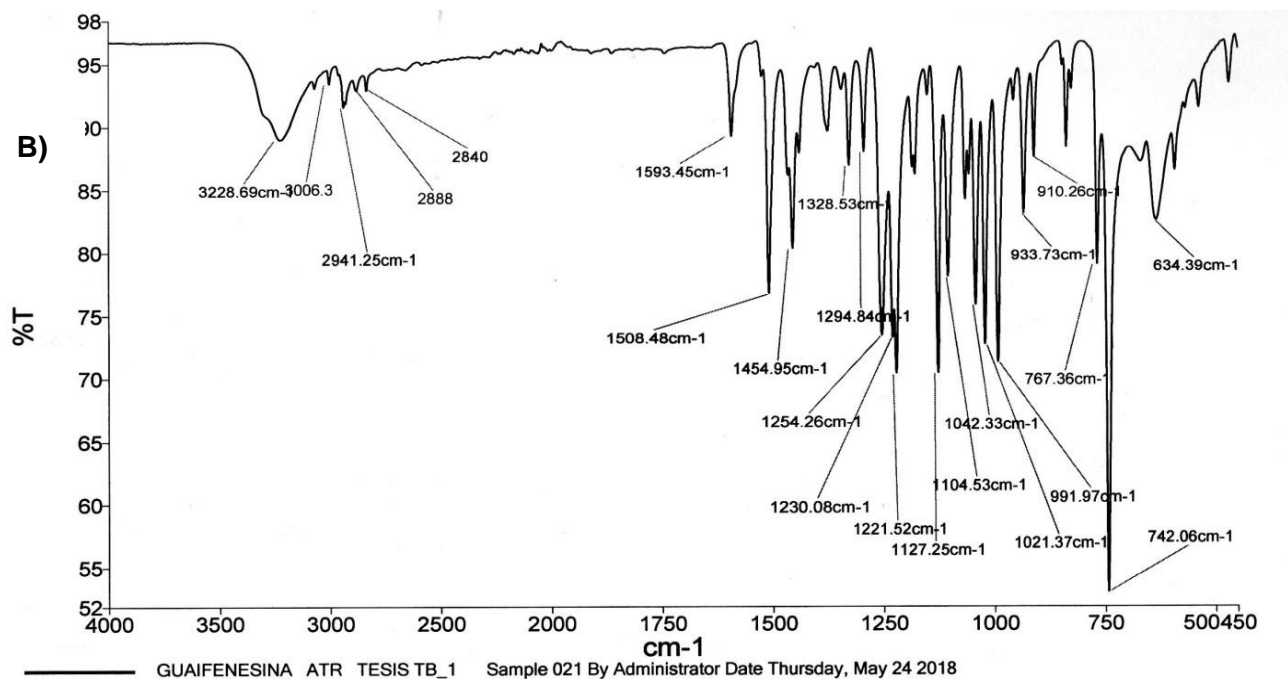
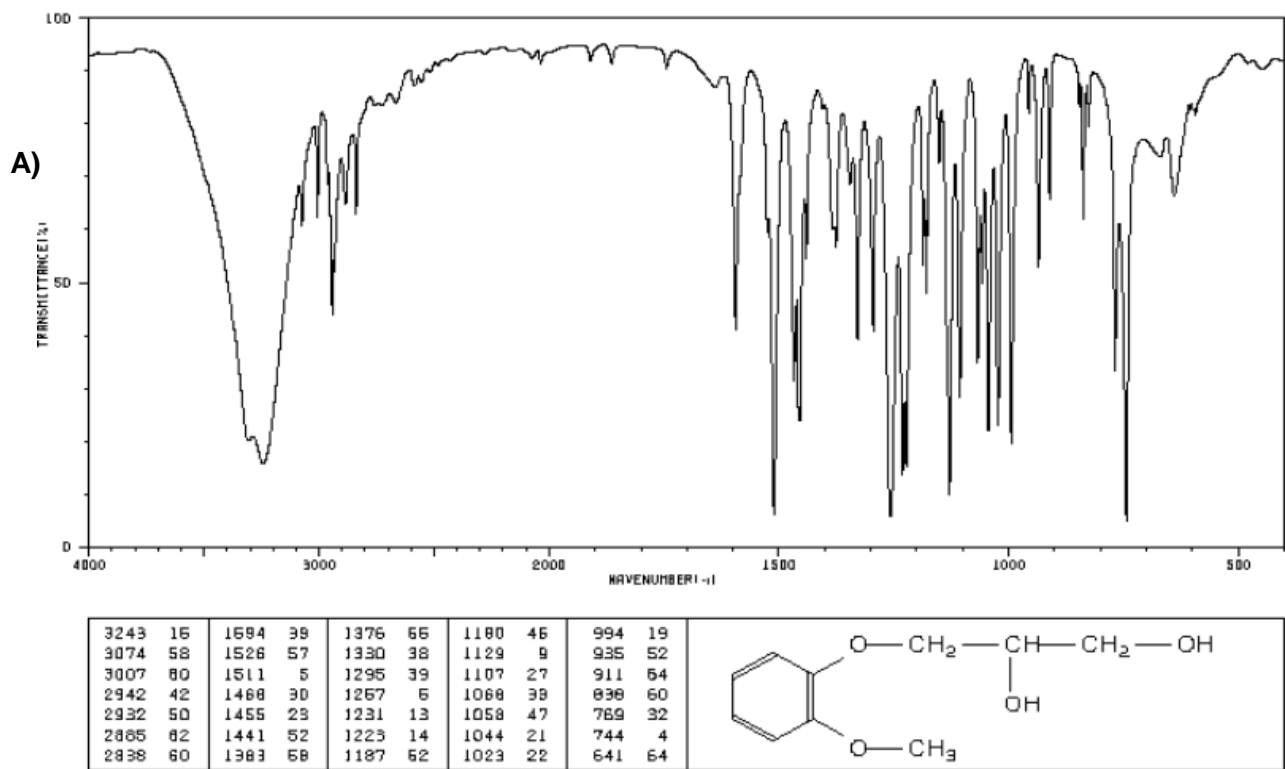


Figura 38. Espectro infrarrojo de la guaifenesina. A) Sustancia de referencia primaria. B) Sustancia de referencia secundaria.

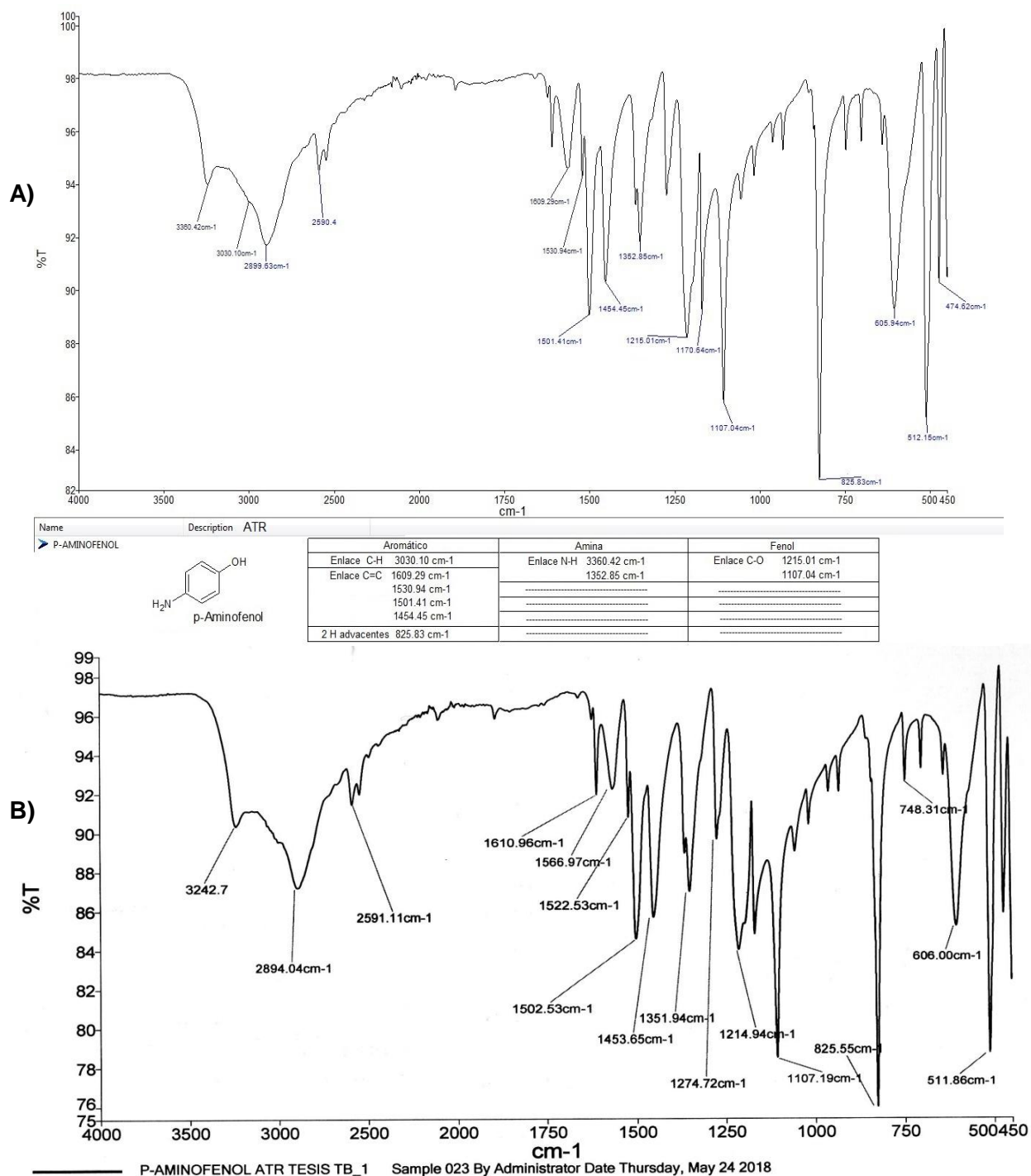


Figura 39. Espectro infrarrojo del p-aminofenol. A) Sustancia de referencia primaria. B) Sustancia de referencia secundaria.

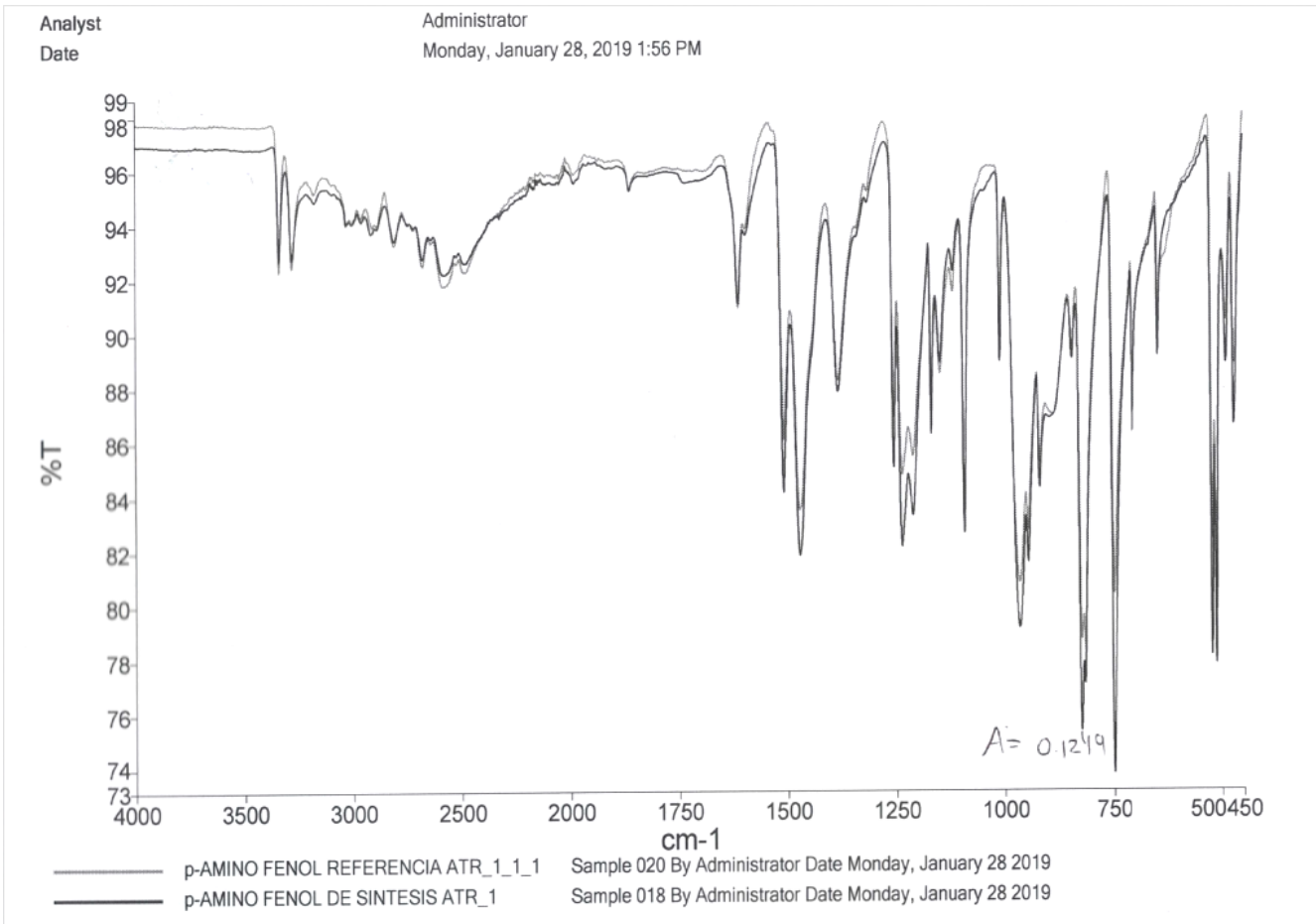
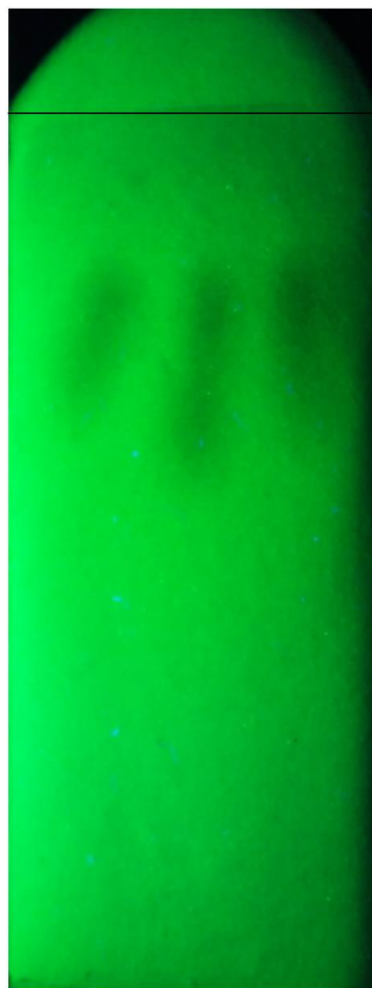


Figura 40. Espectro infrarrojo del p-aminofenol sintetizado y el p-aminofenol como sustancia de referencia primaria.

Anexo 4. Cromatografía en capa fina de p-Aminofenol



Estándar Sintetizado SR-68
1°

Figura 41. Cromatografía en capa fina del p-aminofenol estándar primario, sintetizado y proveniente del CERFyS.

Anexo 5: Especificidad del método para las sustancias de referencia secundarias

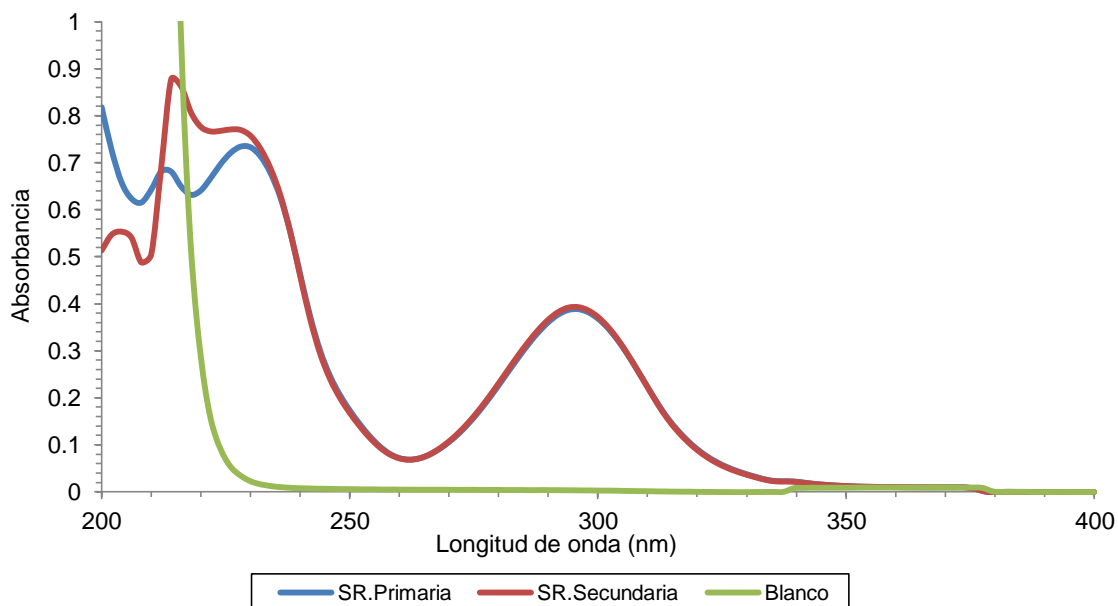


Figura 42. Especificidad del método evaluada a partir de los espectros de absorción obtenidos del ácido acetilsalicílico como sustancia de referencia primaria y secundaria. El blanco fue NaOH 0.1N.

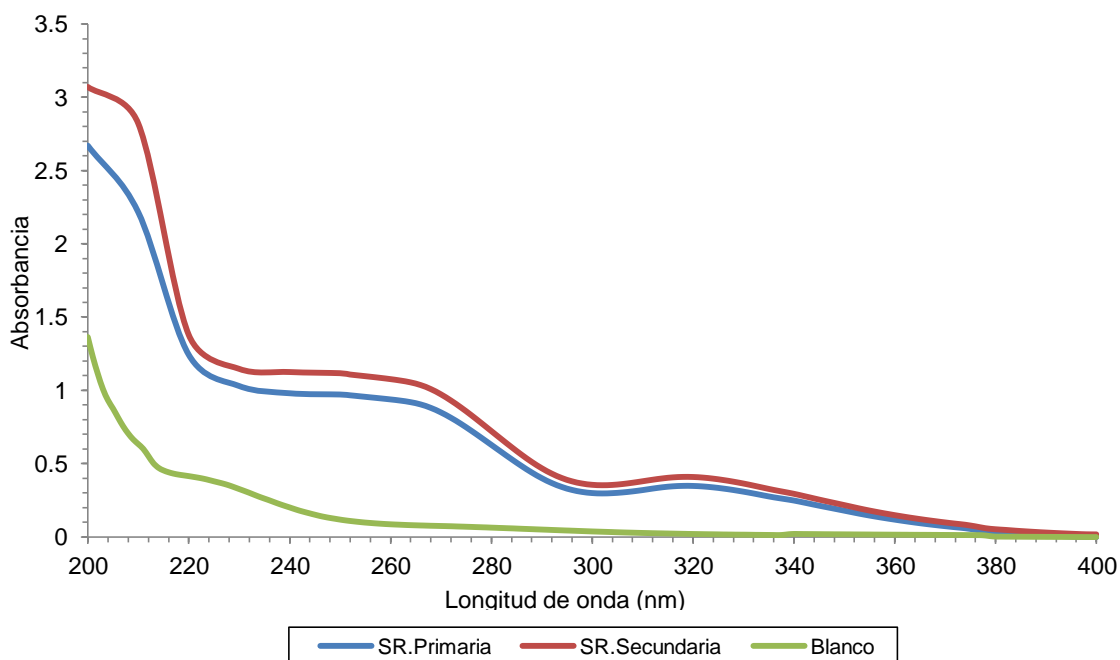


Figura 43. Especificidad del método evaluada a partir de los espectros de absorción obtenidos de la indometacina como sustancia de referencia primaria y secundaria; el blanco empleado fue Etanol:H₂O (7:3)

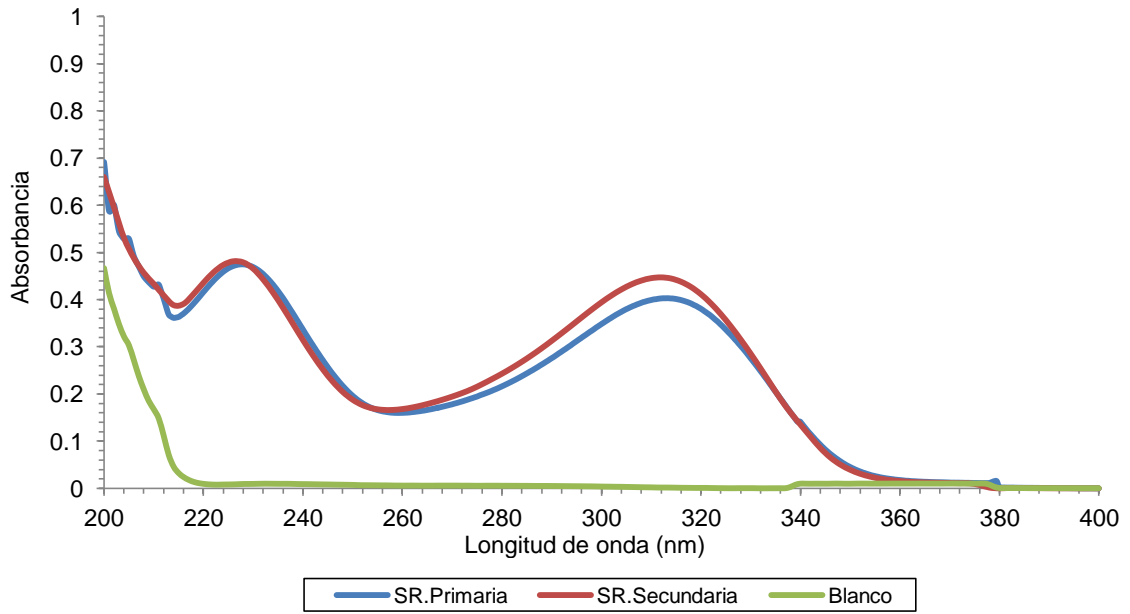


Figura 44. Especificidad del método evaluada a partir de los espectros de absorción obtenidos del clorhidrato de ranitidina como sustancia de referencia primaria y secundaria; el blanco empleado fue H₂O

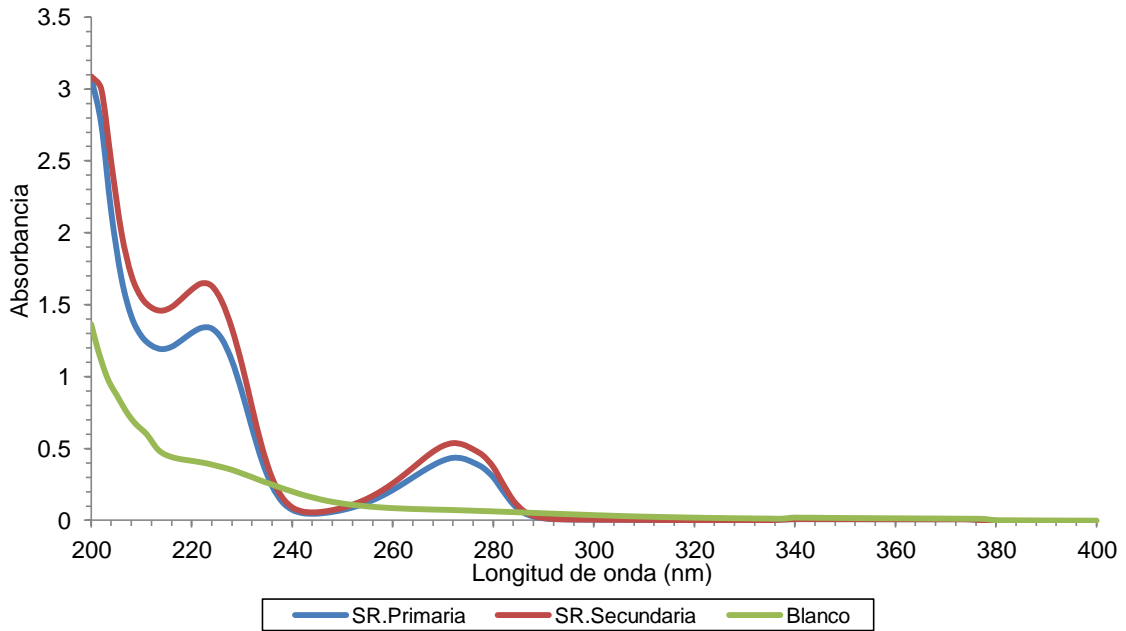


Figura 45. Especificidad del método evaluada a partir de los espectros de absorción obtenidos de la guaifenesina como sustancia de referencia primaria y secundaria; el blanco empleado fue Etanol:H₂O (7:3)

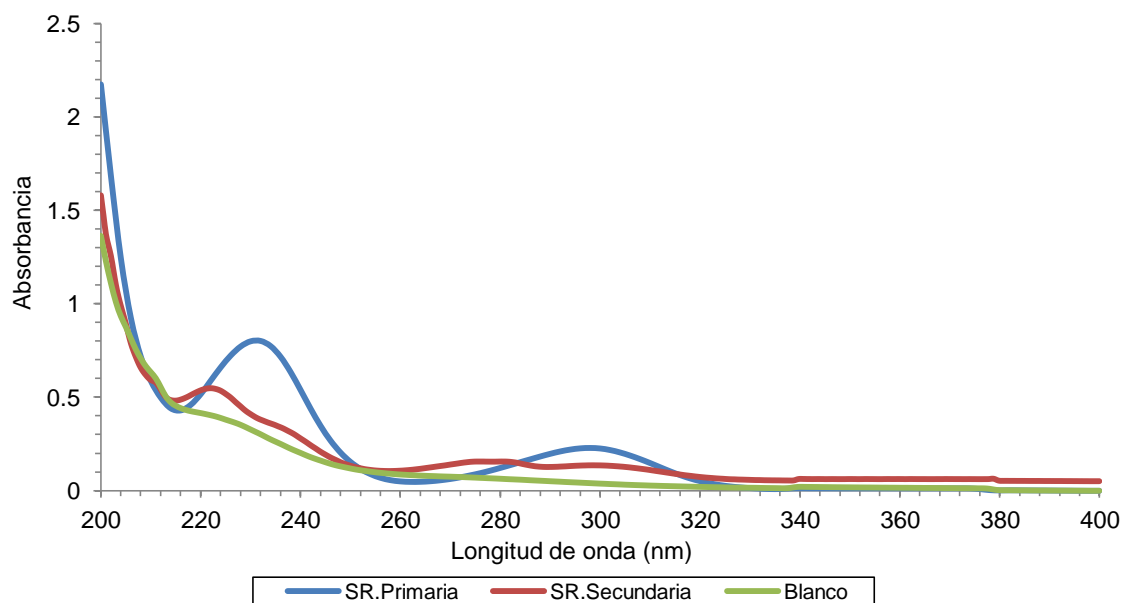


Figura 46. Especificidad del método evaluada a partir de los espectros de absorción obtenidos del p-aminofenol como sustancia de referencia primaria y secundaria (almacén); el blanco empleado fue Etanol:H₂O (7:3)

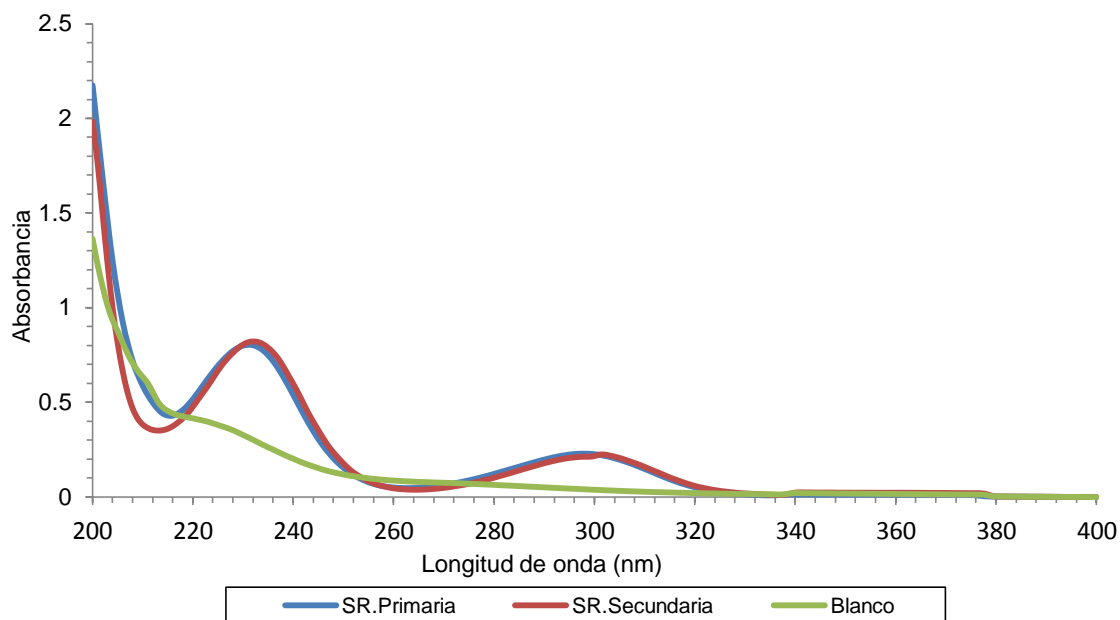


Figura 47. Especificidad del método evaluada a partir de los espectros de absorción obtenidos del p-aminofenol como sustancia de referencia primaria y secundaria (sintetizado); el blanco empleado fue Etanol:H₂O (7:3)

Anexo 6. Formato y metodologías analíticas desarrolladas



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ZARAGOZA



QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

MÉTODOS PARA CUANTIFICAR LA PUREZA DE LAS SUSTANCIAS DE REFERENCIA SECUNDARIAS:

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, CLORHIDRATO DE RANITIDINA,
INDOMETACINA, GUAIFENESINA Y P-AMINOFENOL.

NOMBRE DEL PROGRAMA:

“Caracterización, actualización e implementación de manejo y control de sustancias de referencias secundarias y excipientes utilizados en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza de la carrera de Q.F.B”



Realizó:

Alison Andrea Reyes Montes de Oca

Supervisó:

M en A. Teresa Benítez Escamilla

Q.F.B Mónica Elizabeth Mendoza Jacobo

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

1. Material y equipos

1.1. Materiales

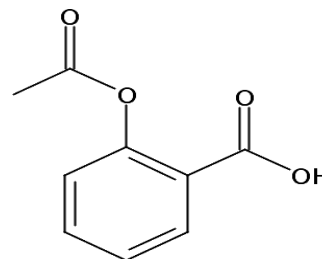
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Matraces volumétrico de 25 mL
- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Celdas de cuarzo de 1 cm

1.2. Equipos

- Sonicador o vórtex

1.3. Instrumentos

- Espectrofotómetro UV-VIS



2. Reactivos

2.1. Sustancia de referencia del analito

2.2. Hidróxido de sodio (NaOH)

- Grado reactivo

3. Metodología

3.1. **Preparación del disolvente (NaOH 0.1N).** Disolver 4 g de NaOH en agua destilada y llevar a un volumen final de 1 L.

3.2. **Preparación del estándar.** Pesar 25 mg en una balanza analítica de la SR primaria de ácido acetilsalicílico y transferir a un matraz volumétrico de 25 mL. Agregar 20 mL de la solución de NaOH 0.1 N al matraz que contiene el ácido acetilsalicílico previamente pesado. Someter a ultrasonido durante 10 minutos para asegurar la completa disolución del analito en el disolvente empleado. Una vez transcurrido el tiempo, llevar al aforo utilizando la solución de NaOH 0.1 N. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar el disolvente empleado y llevar al aforo. La concentración final obtenida será de 20 µg/mL.

3.3. Preparación de la muestra. Pesar 25 mg de la muestra de ácido acetilsalicílico empleando una balanza analítica y transferir a un matraz volumétrico de 25 mL. Agregar 20 mL de la solución de NaOH 0.1 N al matraz que contiene el ácido acetilsalicílico previamente pesado. Someter a ultrasonido durante 10 minutos para asegurar la completa disolución del analito en el disolvente empleado. Una vez transcurrido el tiempo, llevar al aforo utilizando la solución de NaOH 0.1 N. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar al aforo y mezclar con NaOH 0.1 N. La determinación de la pureza del analito se realiza por sextuplicado.

3.4. Procedimiento. Determinar la absorbancia de la preparación estándar y la muestra utilizando el espectrofotómetro UV-VIS, programado para realizar lecturas a una longitud de onda de 297 nm utilizando celdas de cuarzo.

3.5. Cálculos. Para determinar la pureza de la sustancia de referencia secundaria, utilizar la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{C * A_m}{A_{ref}} \right) \left(\frac{D * 100}{M} \right)$$

Donde:

C = Concentración real del estándar expresada en mg por mililitro.*

A_m= Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra.

A_{ref}= Absorbancia obtenida con la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

M= Cantidad real de estándar primario pesado.

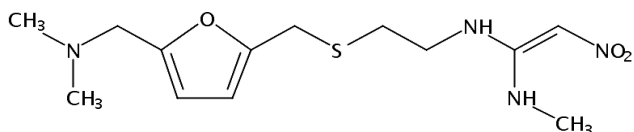
*Para obtener la concentración del estándar, considerar la pureza de la sustancia de referencia primaria.

3.6. **Expresión de resultados:** A partir de las seis determinaciones realizadas obtener el porcentaje promedio. A este valor se le restará el contenido de agua y sustancias volátiles (pérdida por secado) para poder asignar el contenido de la sustancia de referencia secundaria en base seca.

Para que el resultado obtenido sea aceptado como conforme, el coeficiente de variación obtenido deberá ser menor al 1%.

NOTA: Las muestras podrán almacenarse a temperatura ambiente (15 a 30°C) o en condiciones de refrigeración (2 a 8 °C) durante 24 horas en caso de no poder leerlas en el espectrofotómetro el mismo día de preparación.

CLORHIDARTO DE RANITIDINA



• HCl

1. Material y equipos

1.1. Materiales

- Matraces volumétricos de 50 mL
- Matraces volumétrico de 25 mL
- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Celdas de cuarzo de 1 cm

1.2. Instrumentos

- Espectrofotómetro UV-VIS

2. Reactivos

2.1. Sustancia de referencia del analito

2.2. Agua destilada

3. Metodología

3.1. **Preparación del disolvente.** Utilizar agua destilada.

3.2. **Preparación del estándar.** Pesar 12.5 mg en una balanza analítica del estándar primario de clorhidrato de ranitidina y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y llevar al aforo utilizando agua destilada. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 mL. Nuevamente adicionar agua destilada para aforar la solución. La concentración final obtenida será de 10 $\mu\text{g/mL}$.

3.3. **Preparación de la muestra.** Pesar 12.5 mg de la SR secundaria de clorhidrato de ranitidina y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y llevar al aforo utilizando agua destilada. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 mL. Nuevamente adicionar agua destilada para aforar la solución. La concentración final obtenida será de 10 $\mu\text{g/mL}$. La determinación de la pureza del analito se realiza por sextuplicado.

3.4. **Procedimiento.** Determinar la absorbancia de la preparación estándar y la muestra utilizando el espectrofotómetro UV-VIS, programado para realizar lecturas a una longitud de onda de 313 nm utilizando celdas de cuarzo.

3.5. **Cálculos.** Para determinar la pureza de la sustancia de referencia secundaria, utilizar la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{C * A_m}{A_{ref}} \right) \left(\frac{D * 100}{M} \right)$$

Donde:

C = Concentración real del estándar expresada en mg por mililitro.*

A_m= Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra.

A_{ref}= Absorbancia obtenida con la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

M= Cantidad real de estándar primario pesado.

*Para obtener la concentración del estándar, considerar la pureza de la sustancia de referencia primaria.

3.6 Expresión de resultados: A partir de las seis determinaciones realizadas obtener el porcentaje promedio. A este valor se le restará el contenido de agua y sustancias volátiles (pérdida por secado) para poder asignar el contenido de la sustancia de referencia secundaria en base seca.

Para que el resultado obtenido sea aceptado como conforme, el coeficiente de variación obtenido deberá ser menor al 1%.

NOTA: Las muestras podrán almacenarse a temperatura ambiente (15 a 30°C) o en condiciones de refrigeración (2 a 8 °C) durante 24 horas en caso de no poder leerlas en el espectrofotómetro el mismo día de preparación.

GUAIFENESINA

1. Material y equipos

1.1. Materiales

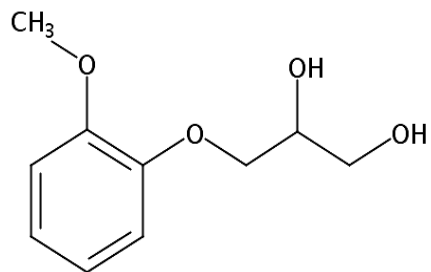
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Matraces volumétrico de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Celdas de cuarzo de 1 cm

1.2. Equipos

- Sonicador o vórtex

1.3. Instrumentos

- Espectrofotómetro UV-VIS



2. Reactivos

2.1. Sustancia de referencia del analito

2.2. Alcohol etílico

- Grado reactivo

2.3. Agua destilada

3. Metodología

3.1. **Preparación del disolvente:** Mezcla binaria alcohol etílico: agua en una proporción 7:3 respectivamente.

3.2. **Preparación del estándar.** Pesar 25 mg en una balanza analítica de la SR primaria de guaifenesina y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar una porción de la mezcla binaria etanol:agua al matraz que contiene el analito previamente pesado para su posterior agitación en el sonicador durante 5 minutos y completar el aforo con el disolvente. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10 mL. Agregar el disolvente empleado y llevar al aforo. La concentración final obtenida será de 50 µg/mL.

3.3. **Preparación de la muestra.** Pesar 25 mg en una balanza analítica de la SR secundaria de guaifenesina y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar una porción de la mezcla binaria etanol:agua al matraz que contiene el analito previamente pesado para su posterior agitación en el sonicador durante 5 minutos y completar el aforo con el disolvente. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10 mL. Agregar el disolvente empleado y llevar al aforo. La concentración final obtenida será de 50 µg/mL. La determinación de la pureza del analito se realiza por sextuplicado.

3.4. **Procedimiento.** Determinar la absorbancia de la preparación estándar y la muestra utilizando el espectrofotómetro UV-VIS, programado para realizar lecturas a una longitud de onda de 274 nm utilizando celdas de cuarzo.

3.5. **Cálculos.** Para determinar la pureza de la sustancia de referencia secundaria, utilizar la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{C * A_m}{A_{ref}} \right) \left(\frac{D * 100}{M} \right)$$

Donde:

C = Concentración real del estándar expresada en mg por mililitro.*

A_m= Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra.

A_{ref}= Absorbancia obtenida con la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

M= Cantidad real de estándar primario pesado.

*Para obtener la concentración del estándar, considerar la pureza de la sustancia de referencia primaria.

3.6. **Expresión de resultados:** A partir de las seis determinaciones realizadas obtener el porcentaje promedio. A este valor se le restará el contenido de agua y sustancias volátiles (pérdida por secado) para poder asignar el contenido de la sustancia de referencia secundaria en base seca.

Para que el resultado obtenido sea aceptado como conforme, el coeficiente de variación obtenido deberá ser menor al 1%.

NOTA: Las muestras podrán almacenarse a temperatura ambiente (15 a 30°C) o en condiciones de refrigeración (2 a 8 °C) durante 24 horas en caso de no poder leerlas en el espectrofotómetro el mismo día de preparación.

INDOMETACINA

1. Material y equipos

1.1. Materiales

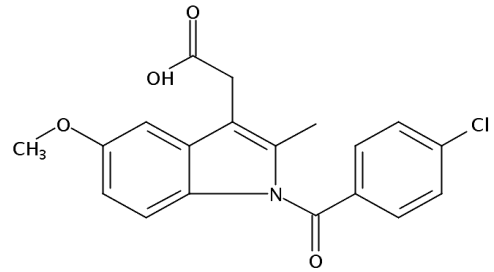
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Matraces volumétrico de 25 mL
- Pipeta volumétrica de 3 mL
- Celdas de cuarzo de 1 cm

1.2. Equipos

- Sonicador o vórtex

1.3. Instrumentos

- Espectrofotómetro UV-VIS



2. Reactivos

2.1. Sustancia de referencia del analito

2.2. Alcohol etílico

- Grado reactivo

2.3. Agua destilada

3. Metodología

3.1. Preparación del disolvente: Mezcla binaria alcohol etílico: agua en una proporción 7:3 respectivamente.

3.2. Preparación del estándar. Pesar 10 mg en una balanza analítica de la SR primaria de indometacin y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar una porción de la mezcla binaria etanol:agua al matraz que contiene el analito previamente pesado para su posterior agitación en el sonicador durante 10 minutos y completar el aforo con el disolvente. Transferir una alícuota de 3 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 mL. Agregar el disolvente empleado y llevar al aforo. La concentración final obtenida será de 24 µg/mL.

3.3. Preparación de la muestra. Pesar 10 mg en una balanza analítica de la SR secundaria de indometacina y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar una porción de la mezcla binaria etanol:agua al matraz que contiene el analito previamente pesado para su posterior agitación en el sonicador durante 10 minutos y completar el aforo con el disolvente. Transferir una alícuota de 3 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 mL. Agregar el disolvente empleado y llevar al aforo. La concentración final obtenida será de 24 µg/mL. La determinación de la pureza del analito se realiza por sextuplicado.

3.4. Procedimiento. Determinar la absorbancia de la preparación estándar y la muestra utilizando el espectrofotómetro UV-VIS, programado para realizar lecturas a una longitud de onda de 320 nm utilizando celdas de cuarzo.

3.5. Cálculos. Para determinar la pureza de la sustancia de referencia secundaria, utilizar la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{C * A_m}{A_{ref}}\right) \left(\frac{D * 100}{M}\right)$$

Donde:

C = Concentración real del estándar expresada en mg por mililitro.*

A_m= Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra.

A_{ref}= Absorbancia obtenida con la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

M= Cantidad real de estándar primario pesado.

*Para obtener la concentración del estándar, considerar la pureza de la sustancia de referencia primaria.

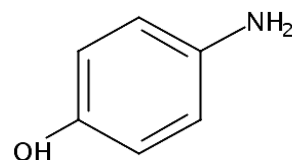
3.6. Expresión de resultados: A partir de las seis determinaciones realizadas obtener el porcentaje promedio. A este valor se le restará el contenido de agua y sustancias

volátiles (pérdida por secado) para poder asignar el contenido de la sustancia de referencia secundaria en base seca.

Para que el resultado obtenido sea aceptado como conforme, el coeficiente de variación obtenido deberá ser menor al 1%.

NOTA: Las muestras podrán almacenarse a temperatura ambiente (15 a 30°C) o en condiciones de refrigeración (2 a 8 °C) durante 24 horas en caso de no poder leerlas en el espectrofotómetro el mismo día de preparación.

P-AMINOFENOL



1. Material y equipos

1.1. Materiales

- Matracas volumétricos de 50 mL
- Matracas volumétrico de 25 mL
- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Celdas de cuarzo de 1 cm

1.2. Equipos

- Sonicador o vórtex

1.3. Instrumentos

- Espectrofotómetro UV-VIS

2. Reactivos

2.1. Sustancia de referencia del analito

2.2. Alcohol etílico

- Grado reactivo

2.3. Agua destilada

3. Metodología

3.1. Preparación del disolvente: Mezcla binaria alcohol etílico: agua en una proporción 7:3 respectivamente.

3.2. Preparación del estándar. Pesar 10 mg en una balanza analítica de la SR primaria de p-aminofenol y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar una porción de la mezcla binaria etanol:agua al matraz que contiene el analito previamente pesado para su posterior agitación en el sonicador durante 5 minutos y completar el aforo con el disolvente. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 mL. Agregar el disolvente empleado y llevar al aforo. La concentración final obtenida será de 8 µg/mL.

3.3. Preparación de la muestra. Pesar 10 mg en una balanza analítica de la SR secundaria de p-aminofenol y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar una porción de la mezcla binaria etanol:agua al matraz que contiene el analito previamente pesado para su posterior agitación en el sonicador durante 5 minutos y completar el aforo con el disolvente. Transferir una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 mL. Agregar el disolvente empleado y llevar al aforo. La concentración final obtenida será de 8 µg/mL. La determinación de la pureza del analito se realiza por sextuplicado.

3.4. Procedimiento. Determinar la absorbancia de la preparación estándar y la muestra utilizando el espectrofotómetro UV-VIS, programado para realizar lecturas a una longitud de onda de 232 nm utilizando celdas de cuarzo.

3.5. Cálculos. Para determinar la pureza de la sustancia de referencia secundaria, utilizar la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{C * A_m}{A_{ref}} \right) \left(\frac{D * 100}{M} \right)$$

Donde:

C = Concentración real del estándar expresada en mg por mililitro.*

A_m= Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra.

A_{ref}= Absorbancia obtenida con la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

M= Cantidad real de estándar primario pesado.

*Para obtener la concentración del estándar, considerar la pureza de la sustancia de referencia primaria.

3.6. Expresión de resultados: A partir de las seis determinaciones realizadas obtener el porcentaje promedio. A este valor se le restará el contenido de agua y sustancias volátiles (pérdida por secado) para poder asignar el contenido de la sustancia de referencia secundaria en base seca.

Para que el resultado obtenido sea aceptado como conforme, el coeficiente de variación obtenido deberá ser menor al 1%.

NOTA: Las muestras podrán almacenarse a temperatura ambiente (15 a 30°C) o en condiciones de refrigeración (2 a 8 °C) durante 24 horas en caso de no poder leerlas en el espectrofotómetro el mismo día de preparación.