



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
DICLOFENACO SÓDICO EN FORMAS FARMACÉUTICAS
Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ANA LILIA APARICIO AGUILAR

MÉXICO, D. F.

AÑO 2011





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ
VOCAL: Profesor: HONORIA FUENTES SIXTOS
SECRETARIO: Profesor: MA. DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRÍA
1er. SUPLENTE: Profesor: GLORIA GARCÍA RAMÍREZ
2° SUPLENTE: Profesor: NATIVIDAD GARCÍA ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

HEMEROTECA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA: Q. PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

SUSTENTANTE: ANA LILIA APARICIO AGUILAR

INDICE

CAPÍTULO 1	Introducción	4
	Objetivos	7
CAPÍTULO 2	Metodología	8
CAPÍTULO 3	Generalidades del diclofenaco sódico	10
CAPÍTULO 4	Aspectos generales sobre métodos de análisis químico	15
4.1	- Cromatografía de líquidos de alta resolución	
4.2	- Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica	
4.3	- Cromatografía en capa fina de alta resolución	
4.4	- Microextracción en fase líquida	
4.5	- Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible	
4.6	- Espectroscopía de fluorescencia	
4.7	- Potenciometría	
4.8	- Validación de métodos analíticos	
CAPÍTULO 5	Comparación de métodos analíticos para la cuantificación de diclofenaco sódico en formas farmacéuticas	32
CAPÍTULO 6	Comparación de métodos analíticos para la cuantificación de diclofenaco sódico en fluidos biológicos	37
CAPÍTULO 7	Análisis de resultados	41
CAPÍTULO 8	Conclusiones	46
BIBLIOGRAFÍA		49

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El consumo de medicamentos falsificados constituye un riesgo para la salud, dado que éstos pueden encontrarse caducos, no contener la cantidad exacta del principio activo, e incluso, podrían contener sustancias tóxicas, generando otras enfermedades o provocando que la enfermedad progrese. En México se calcula que entre un 10 y un 15 % del mercado es falsificado, lo que en dinero representa un billón de dólares aproximadamente¹, mientras que el robo de medicamentos provoca pérdidas anuales de 2000 millones de pesos². La importancia del control químico de productos farmacéuticos, como resultado del impacto social en lo económico y para la salud pública, demandan investigaciones de métodos de análisis rápidos, sensibles, confiables y representativos³.

En un esfuerzo para cumplir con estos requerimientos, han sido propuestos métodos para la cuantificación de diclofenaco sódico basados en técnicas que ofrecen ventajas tales como practicidad, simplicidad y economía en cuanto a reducción en consumo de reactivos y residuos generados, en ésta línea ésta revisión bibliográfica de técnicas aplicadas a la determinación de diclofenaco sódico en fármacos y fluidos biológicos, pretende ser de ayuda al elegir un método alternativo al método oficial, que pueda ser útil en el caso de que no se cuente con un equipo para llevar a cabo la cuantificación de éste fármaco, por cromatografía líquida de alta resolución, observando las ventajas y desventajas que presentan con respecto a otras técnicas.

El Diclofenaco sódico es un fármaco con propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias⁴⁻⁹, presente en numerosas preparaciones farmacéuticas. Su efecto farmacológico está relacionado con la inhibición de la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas, uno de los mediadores del proceso inflamatorio¹⁰⁻¹³.

En 1975, con la introducción del uso de diclofenaco en tratamientos médicos, aparecen en la literatura procedimientos analíticos cuantitativos para la determinación de éste fármaco en materiales biológicos¹⁴, pero es en 1980 cuando se reportaron los primeros análisis obtenidos con éxito para la cuantificación de diclofenaco en muestras biológicas, en el *Journal of Chromatography*, “Determinación del total de metabolitos monohidroxilados de diclofenaco sódico en orina, por cromatografía de gases con detector por captura de electrones”¹⁵, y fue en la segunda mitad de la década de los 80 cuando se prestó atención a los métodos de análisis en medicamentos que contenían éste fármaco.

El diclofenaco sódico, es la sal de sodio derivado del ácido benceno acético, designado químicamente como 2-[(2,6-dicloro-fenil)amino] ácido bencen-acético sal monosódica; es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo "AINE" y puede ser considerado como uno de los pocos fármacos anti-inflamatorios de primera elección usados en el tratamiento de dolores agudos y crónicos, así como padecimientos inflamatorios¹⁶ tales como síndromes dolorosos de la columna vertebral, inflamación y tumefacción dolorosa postraumática y postoperatoria, tras la cirugía dental y en ortopedia, estados dolorosos y/o inflamatorios como el cólico nefrítico, la gota aguda, dismenorrea primaria, ataques de migraña, y también actúa como auxiliar en dolores e inflamaciones severas de oídos, nariz, o garganta. Así mismo es utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias dolorosas de origen reumático y no reumático como artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante¹⁷⁻²¹. Los efectos secundarios del diclofenaco sódico, en particular efectos gástricos son el resultado de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas ya que éstas juegan un rol en la protección de la mucosa gástrica²².

Las técnicas reportadas para la cuantificación de éste fármaco en formas farmacéuticas son: espectrofotometría ultravioleta-visible^{10,23-38}, colorimetría³⁹⁻⁴⁰, cromatografía de capa fina⁴¹⁻⁴², cromatografía de fluido supercrítico⁵⁷⁻⁵⁸, cromatografía líquida de alta resolución tanto en fase normal como en fase reversa y acoplada a técnicas como ionización atmosférica química y espectrometría de masas^{21,43-48} potenciometría⁴⁹⁻⁵⁰, fluorometría³, fotometría de reflectancia difusa⁵¹, calorimetría diferencial de barrido⁵², espectroscopía de fase sólida⁵⁴, electroforesis capilar⁵⁵ y voltametría⁵⁶.

Para la cuantificación de diclofenaco sódico, las técnicas en muestras de fluidos biológicos, hasta ahora reportadas son: cromatografía de gases con detector por captura de electrones y acoplada a espectrometría de masas^{15,57-58}, cromatografía líquida de alta resolución tanto en fase normal, como en fase reversa^{17,59-63}, cromatografía de capa fina⁶⁴, electroforesis de zona capilar con detección electroquímica⁶⁵⁻⁶⁶, fluorometría⁶⁷.

Los métodos hasta ahora utilizados en la cuantificación de diclofenaco sódico tanto en formas farmacéuticas como en muestras de fluidos biológicos son: espectrofotometría por inyección de flujo⁶⁸ y sensor potenciométrico⁶⁹.

En la validación de métodos analíticos, los parámetros de desempeño a estudiar para un método analítico para cuantificación son: precisión, linealidad, exactitud, especificidad y límite de cuantificación del método; los parámetros: estabilidad analítica de la muestra, robustez y tolerancia pueden ser requeridos dependiendo de la naturaleza del método⁷⁰.

Objetivos particulares:

1. Realizar una revisión bibliográfica y hemerográfica de los métodos analíticos que han sido utilizados en las últimas dos décadas para la determinación de diclofenaco de sodio en muestras de fluido biológico y formas farmacéuticas existentes en el mercado.
2. Analizar técnicas actuales, utilizadas para la cuantificación de diclofenaco de sodio en medicamentos y muestras biológicas (orina y plasma humano) y concluir qué método(s) ofrece(n) mayores ventajas para el análisis alternativo al método oficial (*cromatografía de líquidos de alta resolución*) por su simplicidad, economía, sensibilidad, rapidez y precisión.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1. Búsqueda y recopilación de la información obtenida sobre generalidades del diclofenaco de sodio a partir de fuentes electrónicas y bibliográficas.
2. Revisión y recopilación de metodologías publicadas para la cuantificación de diclofenaco de sodio, tanto en fluidos biológicos como formas farmacéuticas, a partir de fuentes electrónicas, hemerográficas y bibliográficas, y construir una tabla cronológica sobre la publicación de dichas técnicas.
3. Buscar los artículos publicados sobre las técnicas recientemente utilizadas para la cuantificación de éste fármaco en la hemerografía en línea y a partir de los artículos rescatados indagar sobre sus fuentes.
4. Descartar los artículos publicados que se encontraban fuera del objetivo de este estudio, tales como, determinaciones cualitativas de diclofenaco sódico, cuantificación de diclofenaco sódico en fluidos biológicos diferentes a orina o plasma humano, o en los que se hacían evaluaciones sobre la interacción fármaco-fármaco, tales publicaciones sólo se contemplaron en la cronología de técnicas reportadas para la determinación de diclofenaco sódico.
5. Analizar las ventajas y desventajas de los artículos seleccionados.
6. Concluir qué técnicas presentan más ventajas, desde el punto de vista teórico, en cuanto a exactitud, precisión, simplicidad y economía se refiere, incluyendo las ventajas y desventajas que ofrecen con respecto a la cromatografía de líquidos de alta resolución en la cuantificación de diclofenaco sódico tanto en fluidos biológicos como en formas farmacéuticas.

CAPÍTULO 3

GENERALIDADES DEL DICLOFENACO SÓDICO

GENERALIDADES DEL DICLOFENACO SÓDICO

3.1. Descripción del diclofenaco sódico

El diclofenaco sódico, es un compuesto sintético no esteroideo derivado del ácido fenilacético que posee actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria^{16,21}, utilizado principalmente en la forma de sal sódica en el tratamiento de formas inflamatorias y degenerativas de reumatismo, artritis reumatoide, artrosis, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, reumatismo extra-articular, trastornos osteomusculares, espondilartritis²⁰, síndromes dolorosos de la columna vertebral, inflamación y tumefacción dolorosa postraumática y postoperatoria por ejemplo, tras la cirugía dental y en ortopedia, estados dolorosos y/o inflamatorios como el cólico nefrítico y la gota aguda, en ginecología por ejemplo dismenorrea primaria, ataques de migraña, también actúa como auxiliar en dolores e inflamaciones severas de oídos, nariz, o garganta, como faringoamigdalitis, otitis y fiebre⁷¹⁻⁷². El gel al 3% de diclofenaco en 2.5% de ácido hialurónico ha demostrado ser efectivo y bien tolerado en el tratamiento de la queratosis actínica⁷³. En oftalmología ha sido usado para aplicaciones perioperativas en cataratas, midriasis, profilaxis y tratamientos a síntomas de inflamación. La disolución oftálmica al 0.1% se recomienda para prevenir la inflamación oftálmica postoperatoria y el colirio al 0.1%, para reducir la miosis intraoperativa⁷⁴.

3.2. Mecanismo de acción del diclofenaco sódico

El mecanismo de acción del diclofenaco sódico, no ha sido totalmente dilucidado, pero se cree que el mecanismo primario, responsable de su acción antiinflamatoria y analgésica, es evitar la síntesis de prostaglandinas, causada por la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX)^{58,69,75}. El diclofenaco sódico es un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa, actúa como inhibidor de la hialuronidasa en la síntesis de prostaglandinas y agregación plaquetaria, con mayor potencia que la indometacina, el naproxeno y otros medicamentos⁷². Hay marcadas diferencias entre los antiinflamatorios no esteroideos, en su inhibición selectiva de los dos subtipos de ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2. Muchos medicamentos han sido diseñados para centrarse en la inhibición de la isoenzima COX-2 como una forma de minimizar los efectos gastrointestinales de otros antiinflamatorios no esteroideos, como la aspirina⁵.

3.3. Propiedades físicas del diclofenaco sódico

El diclofenaco sódico es un polvo blanco ligeramente amarillento, higroscópico e inodoro. El pH de la disolución acuosa al 1% oscila entre 7,0 y 8,5. Inestable a la luz.

Tabla 2. Solubilidad de diclofenaco⁷⁶. Temperatura 25 °C

Solvente	Solubilidad (mg mL ⁻¹)
Metanol	>24
Agua desionizada (pH 5.2)	>9
Acetona	6
Amortiguador de fosfatos (pH 7.2)	6
Acetonitrilo	<1
Ciclohexano	<1
HCl (pH 1.1)	<1

3.4. Propiedades químicas del diclofenaco sódico

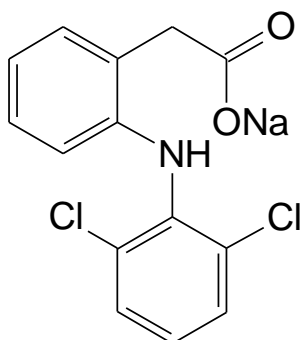


Fig. 1 Fórmula desarrollada del diclofenaco sódico⁷⁷

Tabla 3. Propiedades químicas de diclofenaco sódico⁷⁷

Peso molecular	318.13 g mol ⁻¹
Fórmula condensada	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ N Na O ₂
Composición porcentual	C 52.86%, H 03.17%, Cl 22.29%, N 04.40%, Na 07.23%, O 10.06%

El pka del diclofenaco de sodio en agua es 4 y el coeficiente de partición en disolución amortiguadora acuosa de n-octanol es 13.4 a pH 7⁷¹.

Nombres químicos del diclofenaco sódico⁷⁶⁻⁷⁷:

- 1.2.1. 2-[(2,6-Diclorofenil)amino] sal monosódica del ácido bencen-acético
- 1.2.2. [0-(2,6-dicloroanilino)fenil] sal sódica de ácido acético
- 1.2.3. Ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético
- 1.2.4. Sodio [2-(2,6-dicloroanilino) fenil] acetato

3.5. Efectos adversos del diclofenaco sódico

Pacientes a quienes se administra diclofenaco sódico por vía sistemática pueden presentar: dolor epigástrico, náuseas, vómito y diarrea⁷¹. La inhibición de la enzima ciclooxigenasa, también disminuye la producción de prostaglandinas en el epitelio del estómago, haciéndolo mucho más vulnerable a la corrosión por los ácidos gástricos, ya que éstas juegan un rol en la protección de la mucosa gástrica⁷⁵.

El diclofenaco sódico se encuentra entre los antiinflamatorios no esteroideos mejor tolerados, sin embargo, el 20% de los pacientes en tratamientos a largo plazo experimentan efectos secundarios, de éstos, un 2% tienen que discontinuar el uso del fármaco, debido principalmente a efectos gastrointestinales como el sangrado gastrointestinal oculto y ulceración gástrica, aunque las úlceras ocurren con menor frecuencia que con el uso de otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos²².

Las funciones tanto renal como hepática deberán vigilarse con regularidad durante los tratamientos de larga duración, pues el uso de diclofenaco sódico se ha asociado con nefrotoxicidad, por mecanismos que no han sido bien identificados⁷⁸.

De manera similar a otros antiinflamatorios no esteroideos, el diclofenaco causa raros pero significativos casos de hepatotoxicidad seria, de 1-2 casos por millón²⁰. Puede producirse dolor, y ocasionalmente, lesión tisular en el lugar de la inyección cuando se administra por vía intramuscular. La disolución oftálmica de este principio activo puede causar prurito.

3.6. Interacción del diclofenaco sódico con otros fármacos

El diclofenaco no debe ser administrado por vía intravenosa a pacientes que ya han recibido otros antiinflamatorios no esteroideos o anticoagulantes, incluidas bajas dosis de heparina⁷¹, ya que puede aumentar su efecto. Se ha reportado un deterioro en la función renal cuando el diclofenaco es administrado junto con ciclosporina⁸⁰ o triamtereno⁸¹ y disminución en la biodisponibilidad de diclofenaco cuando se administra en forma conjunta con colestipol⁸², ya que éste último produce un efecto similar pero en menor grado.

3.7. Contraindicaciones del diclofenaco sódico

Hipersensibilidad reconocida al diclofenaco sódico, reacciones alérgicas seguidas al uso de ácido acetil salicílico u otros antiinflamatorios no esteroideos, encontrarse en embarazo o lactancia, ulceración estomacal activa, sangrado gastrointestinal, hipertensión arterial, colitis ulcerativa, pacientes convalecientes de cirugía cardíaca, insuficiencia hepática ó renal.

3.8. Formas farmacéuticas del diclofenaco sódico

Tabla 4. Formas farmacéuticas de diclofenaco sódico y dosis

Formulación	Dosis
Comprimido efervescente	50 mg
Tabletas de liberación controlada	75, 100 ó 150 mg
Supositorio	50 y 100 mg
Ampolleta	50 y 75 mg
Parche	15 mg
Colirio	0.1%
Ungüento	0.1%

CAPÍTULO 4

ASPECTOS GENERALES SOBRE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO

ASPECTOS GENERALES SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO

Los métodos de análisis, que se tocarán en este capítulo sólo corresponden a las técnicas más utilizadas, en su mayoría recientemente publicadas y que de acuerdo con la literatura presentaron mejores resultados para cuantificar diclofenaco sódico tanto en formas farmacéuticas, así como en fluidos biológicos.

4.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica que se desarrolló a principios del siglo XX, la cual hace posible la separación de las sustancias de una mezcla. Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía líquida de alta eficiencia, es la más conocida. Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito de la cromatografía de gases, a la que se añade el correspondiente análisis de compuestos termosensibles o de aquellos con masas moleculares muy grandes o incluso polares. Esta técnica es conocida también como cromatografía de líquidos a alta presión⁷⁷.

Fundamento

En la cromatografía de líquidos de alta resolución de tipo isocrática, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie, mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil.

El tiempo que tarda un compuesto a ser eluído de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía.

Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. Una mejora introducida a esta técnica, es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. El gradiente utilizado varía en función del carácter hidrofóbico del compuesto y separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria.

Cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal fue el primer tipo de sistema de cromatografía líquida de alta resolución utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, útil cuando el compuesto de interés es muy polar, dicho compuesto se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de absorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

Este tipo de cromatografía cayó en desuso en los años setenta con el desarrollo de la cromatografía líquida de fase reversa, debido a la falta de reproductibilidad de los tiempos de retención dado que los disolventes práticos cambiaban el estado de hidratación de la sílica o alúmina de la cromatografía.

Cromatografía de fase reversa

La cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza no polar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente no polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se le denomina cromatografía de líquidos de alta resolución sin ninguna otra especificación, éste tipo de cromatografía se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente no polar, y una fase estacionaria no polar.

La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento no polar del analito expuesto al disolvente. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente no polar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Equipo

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de un sistema de bombeo, un sistema de inyección, una columna, un detector y un registrador de señales.

El sistema de bombeo impulsa la fase móvil a través de la columna, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante. Existen bombas de flujo constante, que funcionan a base de pistones y bombas de presión constante que emplean presión de un gas inerte para presurizar el disolvente. El sistema de inyección más sencillo consiste en introducir la muestra de forma manual a través de una jeringa, otro sistema más preciso es el de inyectoros con asas intercambiables de volumen fijo, que desvía el flujo de disolvente mientras se introduce la muestra y un tercer sistema que minimiza errores al inyectar es el automático que funciona por un mecanismo servo-regulado.

El detector puede medir alguna propiedad de la fase móvil (índice de refracción o conductividad eléctrica) o alguna propiedad del analito (detector de luz ultravioleta visible, de radioactividad, de fluorescencia o electroquímico).

La columna es la parte fundamental de un sistema cromatográfico, cuyo material de empaque se selecciona dependiendo de la separación que se pretende hacer. El diámetro interno de una columna utilizada en la cromatografía de líquidos de alta resolución es un aspecto crítico, que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Las columnas de diámetro interno más grande (>10 mm) se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su utilización posterior. En cambio, las columnas de diámetro interno menor (4-5 mm) se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, y se caracterizan por el aumento la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes que conllevan. Estas columnas se suelen denominar columnas de rango analítico y normalmente están asociadas a un detector ultravioleta-visible.

Las columnas de tipo capilar, con diámetro inferior a 0.3 mm, son utilizadas principalmente cuando se acopla el sistema a espectrometría de masas.

Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste, debe ser registrada por un graficador, un integrador o un sistema computarizado de procesamiento de datos. El uso de integradores electrónicos evita los errores de medición de las áreas, puesto que registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.

El éxito en la aplicación de ésta técnica para un compuesto dado, depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detección, etc.

4.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica.

Aunque los métodos cromatográficos proporcionan resultados reproducibles y confiables, requieren óptima resolución de los analitos sobre los excipientes de la formulación antes de ser analizados. La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. En la industria es altamente utilizado en el análisis elemental de semiconductores, biosensores y cadenas poliméricas complejas. Recientemente la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas se ha utilizado en análisis clínicos y farmacéuticos proporcionando mejor eficiencia en la detección, caracterización y cuantificación de fármacos.

Fundamento

El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto⁸⁵.

La técnica de detección de iones se basa en el fenómeno conocido como desbastado de partículas centradas en un blanco, que son bombardeadas por iones, átomos o moléculas. El proceso de dispersión produce iones secundarios en el rango de las energías cinéticas traslacionales. Las distribuciones de energía son distintas para iones atómicos o moleculares. La eficiencia de ionización del sistema es definida como la fracción de los átomos esparcidos que se vuelven ionizados. El acoplamiento del espectrómetro de masas al cromatógrafo de líquidos permite detectar y cuantificar muy bajos niveles del fármaco con alto grado de especificidad y en un tiempo de análisis relativamente corto sin la necesidad de la resolución cromatográfica completa de los analitos. La inclusión de ionización química a presión atmosférica ha mejorado la robustez y la facilidad del uso del equipo. Éste tipo de ionización es muy suave y produce iones moleculares positivos y negativos de moléculas polares. Los iones moleculares pueden ser usados para la identificación del analito de interés en un análisis cualitativo y puede ser monitoreado para mejorar datos cuantitativos.

Equipo

Un espectrómetro de masas tiene tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector. La fuente de iones es el elemento del espectrómetro que ioniza el material a ser analizado. Luego los iones son transportados por los campos magnéticos o eléctricos al analizador total. Las técnicas para la ionización han sido dominantes para determinar qué tipos de muestras se pueden analizar por espectrometría de masa. La ionización por el electrón y la ionización molecular se utilizan para los gases y los vapores. Las fuentes inductivas del plasma se utilizan, sobre todo, para el análisis del metal en una amplia gama de los tipos de las muestras. Otras técnicas incluyen la ionización química rápida del bombardeo del átomo, termo spray y la ionización química por presión atmosférica. El analizador de masa es la pieza más flexible del espectrómetro de masa. Utiliza un campo eléctrico o magnético para afectar la trayectoria o la velocidad de las partículas cargadas de una cierta manera. La fuerza ejercida por los campos eléctricos y magnéticos es definida por la fuerza de Lorentz:

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B})$$

Donde: E es la fuerza del campo eléctrico, B es la inducción del campo magnético, q es la carga de la partícula, v es su velocidad y \times simboliza el producto cruz o producto vectorial.

Los iones incorporan un campo magnético o el campo eléctrico que dobla las trayectorias del ion dependientes en su masa y carga, desviando la mudanza más rápida, iones más ligeros. Así, el analizador dirige las partículas al detector, variando un campo eléctrico o magnético que se basa en el cociente masa/carga (m/z).

Actualmente existen diferentes métodos para "filtrar" los iones respecto a su relación masa/carga. El más comúnmente usado es el denominado cuadrupolo. Se compone de 4 barras alargadas en formación cuadrada, conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos, a dichos pares (polos) se les aplica una tensión de radiofrecuencia variable que sintoniza con un determinado ion. Cuando existe sintonía entre el ion que está pasando por ellas y la frecuencia aplicada, dicho ion continúa su camino; desviándose todos los demás no sintonizados fuera del cuadrupolo y de esta manera no impactan en el detector. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie.

4.3 Cromatografía en capa fina de alta resolución

Entre los métodos de cromatografía plana están la cromatografía en capa fina, la cromatografía en papel y la electrocromatografía, cada uno utiliza un recubrimiento fino sobre una superficie de vidrio, plástico o metal. La cromatografía en capa fina es de gran importancia en la industria farmacéutica para examinar la pureza de las sustancias y ha encontrado múltiples aplicaciones en los laboratorios clínicos, estudios bioquímicos y biológicos⁸³.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la cromatografía en capa fina era considerada una técnica cualitativa simple y rápida, para separar mezclas no demasiado complejas, pero su aplicabilidad cuantitativa resultaba una pobre alternativa frente a otras técnicas cromatográficas como la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Sin embargo, actualmente, debido a los cambios introducidos en esta técnica, en lo que se refiere a la calidad de los adsorbentes, equipos para aplicar la muestra y sistemas de detección, el interés por la cromatografía en capa fina ha vuelto a resurgir, siendo considerada una técnica útil para separar y determinar cualitativa y cuantitativamente mezclas complejas a nivel de trazas.

Estos cambios han llevado a modificar el nombre de la técnica, ahora denominada cromatografía en capa fina de alta resolución, al igual que ocurrió cuando se mejoró la capacidad de resolución de la cromatografía líquida en columna, y se designó cromatografía líquida de alta resolución.

Fundamento

Dicha técnica consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), distribuido de manera uniforme sobre una superficie plana, dicho adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permiten el paso de la fase móvil, la cual avanza por capilaridad, ayudada en ocasiones por un potencial eléctrico o gravedad.

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico, dicha característica se conoce como R_f (relación de frentes) y representa la distancia recorrida por el compuesto, con relación a la distancia recorrida por la fase móvil, por lo que sus valores siempre se encontraran entre 0 y 1.

$R_f = \text{Distancia recorrida por un compuesto desde el origen} / \text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil.}$

Equipo

El equipo para este tipo de cromatografía consiste en cromatoplasmas, cámara para el desarrollo de la cromatografía y luz ultravioleta para el revelado. Las cromatoplasmas son generalmente de vidrio, recubiertas con la capa del adsorbente (gel de sílice o alúmina), el grosor de dicha capa variará de 0.25 mm a 0.30 mm, las placas se dejan secar al aire y se deshidratan a 110° C, durante 30 minutos antes de utilizarse⁷⁷.

La cámara para la cromatografía se emplea en condiciones de saturación, para lo cual se forra interiormente con papel filtro y con la fase móvil se humedece el papel y se vacía fase móvil en el fondo para que alcance una altura de líquido de 0.5 cm a 1 cm de altura, y se tapa herméticamente, la cámara se mantiene en dichas condiciones de 45 minutos a una hora antes de utilizarse.

La aplicación de las disoluciones de muestra y de referencia sobre la cromatoplaca se hace con una micropipeta o microjeringa a 2 cm del borde inferior de la cromatoplaca y dichas aplicaciones deben estar suficientemente separadas entre ellas para evitar que se mezclen.

Posteriormente se introducen en la cámara de desarrollo, cerrando ésta herméticamente a temperatura ambiente, hasta que la fase móvil ascienda a la altura deseada. Finalmente se saca la cromatoplaca y se deja evaporar el disolvente para su revelado bajo una lámpara de luz ultravioleta con longitud de onda de 254 nm y/o 365 nm.

4.4 Microextracción en fase líquida.

Los métodos analíticos, generalmente requieren un paso de extracción y preconcentración antes de llevar a cabo la detección de compuestos orgánicos presentes a nivel de trazas, en matrices medioambientales y biológicas. El pretratamiento de la muestra mejora la sensibilidad y reduce las interferencias de la matriz. En análisis medioambiental y biomédico se utilizan una gran variedad de técnicas de extracción y preconcentración, incluyendo la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida, la extracción líquido-gas y el equilibrio líquido-gas, entre las más habituales.

Una tendencia actual en química analítica es la miniaturización. Las técnicas miniaturizadas para el tratamiento de las muestras son: la microextracción líquido-líquido, la microextracción en fase sólida, la extracción dinámica en fase sólida, la microextracción sobre una jeringa empaquetada, la microextracción en fase líquida, la microextracción sobre una sola gota y la extracción sobre una membrana. Estas técnicas permiten que los análisis sean más rápidos, presentando una mayor capacidad de procesamiento de muestras, un menor consumo de disolvente y muestra, un menor costo por unidad de muestra y una mejora de la sensibilidad.

En general, la reducción en el consumo de disolventes contribuye a una reducción significativa de costos. Algunas de estas técnicas permiten realizar análisis de campo. En muchos casos, las técnicas miniaturizadas de preparación de muestras pueden automatizarse y operar en línea con el instrumento de medida. El acoplamiento en línea entre extracción y análisis aumenta la sensibilidad y minimiza las posibles pérdidas de analito.

4.5 Espectrofotometría ultravioleta-visible

Fundamento

La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha esencialmente monocromática. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la zona ultravioleta hasta la visible del espectro. El intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta de 185 nm a 400 nm y la visible a 400 nm a 800nm⁸⁴. La espectrofotometría en la zona visible, es la medida de la absorción de luz visible, que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia.

En general, los espectros ultravioleta y visible de una sustancia, no tienen un alto grado de especificidad, sin embargo son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias constituyen un medio útil de identificación adicional.

La energía de un haz radiante disminuye en relación con la distancia que viaja a través de un medio absorbente. También disminuye en relación con la contracción de iones o moléculas absorbentes presentes en medio. Estos dos factores determinan la proporción de energía incidente total que es transmitida. La disminución de la energía de radiación monocromática que pasa a través de un medio absorbente homogéneo, se establece cuantitativamente por la ley de Beer⁷⁷:

$$A = \epsilon \ell c$$

Donde : A es la absorbencia, ϵ es la absorptividad molar, ℓ longitud de la trayectoria de la energía luminosa expresada en cm y c es la concentración de la sustancia expresada en mol L⁻¹.

La espectrofotometría de absorción como procedimiento de valoración, se basa en el hecho de que la absorptividad molar de una sustancia en términos generales, es una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, de la longitud interna de la celda y de la concentración, por lo cual, ésta última puede determinarse fotométricamente.

La ley de Beer sólo se cumple a ciertas concentraciones, cuando la disolución es homogénea y no fluorescente, cuando el soluto no forma asociaciones variables con el disolvente y cuando la luz utilizada es monocromática. Las desviaciones a la ley de Beer pueden ser causadas por variables de origen químico o instrumental. Entre las desviaciones debidas al instrumento se encuentra la radiación policromática, el efecto de la amplitud de la rendija o luz difusa o parásita.

Equipo

El espectrofotómetro consta de una fuente de energía, de un dispositivo dispersante, por ejemplo de un prisma o una rejilla de difracción, de rendijas para seleccionar la banda de longitudes de onda, de una celda o portador de la sustancia de prueba, de un detector de la energía radiante, amplificadores asociados y dispositivos de medición y registro.

4.6 Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia, es un tipo de espectroscopía electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra.

Fundamento

Utilizando un haz de luz, por lo general, luz ultravioleta, se excita a los electrones de las moléculas de ciertos compuestos, provocando que emitan luz de una menor energía, generalmente luz visible (aunque no necesariamente). Las moléculas tienen diferentes estados, llamados niveles de energía. La espectroscopía de fluorescencia se refiere principalmente a estados vibracionales y electrónicos.

En general, las especies a examinar tendrán un estado electrónico basal (un estado de baja energía) de interés, y un estado electrónico excitado de mayor energía. Dentro de cada uno de estos estados electrónicos hay diferentes estados vibracionales.

En la espectroscopia de fluorescencia, primero se excita la muestra mediante la absorción de un fotón de luz, desde su estado electrónico basal a uno de los distintos estados vibracionales del estado electrónico excitado.

Las colisiones con otras moléculas causan que la molécula excitada pierda energía vibracional hasta que alcanza el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado.

La molécula desciende luego a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón en el proceso. Dado que las moléculas pueden caer a cualquiera de los diferentes niveles de vibración en el estado basal, los fotones emitidos tendrán diferentes energías y, por lo tanto, frecuencias.

Y así, mediante el análisis de las diferentes frecuencias de luz emitida por espectroscopía de fluorescencia, junto con sus intensidades relativas, se puede determinar la estructura de los diferentes niveles de vibración.

Equipo

En la espectroscopía de fluorescencia se utilizan dos tipos generales de equipos: Fluorómetros de filtro que utilizan filtros para aislar la luz incidente y la luz fluorescente y espectrofluorómetros que usan monocromadores de retículo de difracción para aislar la luz incidente y la luz fluorescente.

La luz de una fuente de excitación pasa a través de un filtro o monocromador, e incide sobre la muestra. Una parte de la luz incidente es absorbida por la muestra, y algunas de las moléculas de la muestra producen una fluorescencia. La luz fluorescente es emitida en todas las direcciones.

Parte de esta luz fluorescente pasa a través de un segundo filtro o monocromador y llega a un detector, el cual muy a menudo se encuentra a 90° con respecto al haz de luz incidente para minimizar el riesgo de que la luz incidente reflejada o transmitida llegue al detector.

Diversas fuentes de luz pueden ser utilizadas como fuentes de excitación, incluyendo el láser, fotodiodos y lámparas; arcos de xenón y lámparas de vapor de mercurio.

Para medir los espectros de excitación, la longitud de onda que pasa a través del filtro o monocromador de emisión se mantiene constante mientras que el monocromador de excitación escanea. El espectro de excitación generalmente es idéntico al espectro de absorción, ya que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la absorción. El porcentaje de fluorescencia recogido por el detector también depende del sistema.

Por otra parte, el porcentaje de fotones detectados, varía entre los diferentes detectores, según la longitud de onda y el tiempo. Cuando las longitudes de onda de excitación y de emisión están próximas no debe confundirse la fluorescencia emitida por la muestra con emisiones parásitas.

Los tipos más importantes de dispersión en este contexto son la dispersión de Rayleigh y la de Raman. La luz dispersa por dispersión de Rayleigh tiene la misma longitud de onda que la luz incidente, mientras que en la dispersión Raman, la luz cambia a longitudes de onda más largas⁸⁴.

4.7 Potenciometría

La potenciometría es una técnica electroanalítica con la que se puede determinar la concentración de una especie electroactiva en una disolución empleando un electrodo de referencia, electrodo con un potencial constante con el tiempo y conocido y un electrodo de trabajo, electrodo sensible a la especie electroactiva.

Fundamento

La potenciometría mide pasivamente el potencial de una disolución entre dos electrodos, afectando muy poco a la disolución en el proceso. El potencial se relaciona entonces con la concentración de uno o varios analitos. Toda determinación potenciométrica se basa en una medida de diferencia de potencial, en condiciones de corriente nula, entre dos electrodos sumergidos en una disolución de la muestra.

Equipo

La estructura de la celda utilizada se designa a menudo como un electrodo a pesar de que en realidad contiene dos electrodos: un electrodo indicador y un electrodo de referencia.

La potenciometría generalmente utiliza electrodos contruidos selectivamente sensibles a los iones de interés. Cada uno constituye una semipila.

El electrodo denominado externo de referencia, es una semicelda electroquímica de referencia, cuyo potencial es constante en relación con el de la disolución muestra. El otro, denominado electrodo selectivo de iones, es el electrodo de medida o electrodo indicador, que conlleva un electrodo interno de referencia bañado en una disolución de referencia separada de la disolución de muestra por una pared llamada membrana.

La diferencia de potencial entre el electrodo interno de referencia y la pared interna de la membrana del electrodo selectivo es una constante, fijada en la fabricación (naturaleza del electrodo interno de referencia y disolución interna)⁸⁶.

En contraposición, la diferencia de potencial que aparece entre la pared externa de la membrana y la disolución muestra, depende de la actividad del analito a medir. Cuando se miden disoluciones acuosas, el electrodo externo de referencia más utilizado es el electrodo Ag/AgCl/KCl.

El contacto eléctrico con la disolución a medir se efectúa por medio de una fina pastilla porosa de vidrio.

Los iones tienen tendencia a migrar a través de esta membrana, y de ello resulta un débil potencial denominado potencial de unión E_J (o potencial de difusión) que se disminuye interponiendo un puente salino constituido por una disolución saturada de KCl. Por lo tanto, la diferencia de potencial, E_{celda} , medida es la suma de:

$$E_{celda} = E_{IRE} - E_{ERE} + E_J = E_{IRE} + E_{memb} - E_{ERE} + E_J$$

Donde: E_J es el potencial de difusión (unión); E_{ERE} , es el potencial de electrodo de referencia exterior, E_{IRE} es el potencial de electrodo de referencia interno con respecto al tapón interno y E_{memb} representa el potencial global de membrana.

Tanto el potencial de referencia exterior como el interno son independientes de la concentración c_i del analito a medir.

La diferencia de potencial medida se debe únicamente a la membrana (aproximándose a E_j) la diferencia de potencial medida está relacionada con la actividad a_i de la especie iónica i a analizar en la disolución muestra, que se expresa con la ecuación de Nernst⁸⁶:

$$E_{celda} = E' + \frac{2,303}{z_i} \left(\frac{RT}{F} \right) \log a_i$$

Donde: E' es el potencial estándar que tiene en cuenta todos los otros potenciales; R es la constante de los gases ideales; T la temperatura; z_i la carga del ión i medida cuya actividad es a_i ; y F es la constante de Faraday.

La concentración de los iones presentes y la fuerza iónica varían poco a lo largo de la medida en comparación con la concentración del ión a medir. Cuando dos iones diferentes reaccionan entre ellos de forma estequiométrica, es posible utilizar este hecho para determinarlos.

El punto final de la medida se caracteriza por la desaparición total de una de las especies o por la aparición de un exceso de una de ellas, o también por la aparición o desaparición de una especie secundaria.

4.8 Validación de métodos analíticos

En la validación de métodos analíticos, los parámetros de desempeño a estudiar para un método analítico para cuantificación son: precisión, linealidad, exactitud y límite de cuantificación del método; los parámetros: estabilidad analítica de la muestra, robustez y tolerancia pueden ser requeridos dependiendo de la naturaleza del método⁷⁰.

A continuación se presentan los criterios de aceptación, para dichos parámetros.

Tabla 1. Criterios de aceptación de parámetros de validación

<p>Precisión</p> <p>Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea</p>	<p>CV (coeficiente de variación) $\leq 1.5\%$ para métodos fisicoquímicos CV $\leq 3\%$ para métodos biológicos En ambos casos se preparan un sextuplicado de disoluciones</p>
<p>Adecuabilidad del sistema (Métodos cromatográficos)</p> <p>Verificación de que el sistema opera con base a criterios preestablecidos que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados</p>	<p>CV $\leq 2\%$ para la respuesta analítica K' (factor de capacidad)>2 R (resolución)>2 T (factor de coelección)<2 Inyectar por quintuplicado la disolución de adecuabilidad</p>
<p>Linealidad</p> <p>Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida son proporcionales a la concentración de un analito en un intervalo determinado</p>	<p>r^2 (coeficiente de correlación) ≥ 0.98 Preparar por lo menos por triplicado, 5 niveles de concentración, la concentración central debe ser igual a la concentración de la disolución de referencia. El intervalo para contenido/valoración de impurezas, se considera desde 0% hasta un 20% por arriba de la especificación.</p>
<p>Exactitud y Repetibilidad del método</p> <p>Concordancia entre un valor obtenido y el valor de la referencia</p>	<p>El intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro (IC_{μ}), debe estar entre: 98-102% para métodos cromatográficos y volumétricos 97-103% para métodos químicos o espectrofotométricos El CV del porcentaje de recobro debe ser no mayor a: 2% para métodos cromatográficos y volumétricos y no mayor a 3% para métodos químicos o espectrofotométricos. Preparación de un placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a la muestra, por sextuplicado adicionar el analito. El análisis se práctica de principio a fin bajo las mismas condiciones</p>
<p>Límite de cuantificación del método</p> <p>Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión o exactitud aceptables</p>	<p>Preparar por lo menos tres concentraciones de la sustancia de interés, simultáneamente preparar 5 blancos. Medir las respuestas y sin incluir los blancos calcular el valor de la pendiente (b_1) y el coeficiente de determinación que no debe ser mayor a 0.98. Para los blancos, calcular la desviación estándar de los blancos (S_b). El límite de cuantificación debe ser menor a la especificación del contenido/valoración de la prueba de impurezas. Y el límite de cuantificación con base a la señal de ruido se calcula con la ecuación: $LC = (10XS_b) / b_1$</p>

<p>Límite de detección</p> <p>Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada</p>	<p>Preparar por lo menos tres concentraciones de la sustancia de interés, simultáneamente preparar 5 blancos. Medir las respuestas y sin incluir los blancos calcular el valor de la pendiente (b_1) y el coeficiente de determinación que no debe ser mayor a 0.98. Para los blancos, calcular la desviación estándar de los blancos (S_b).</p> <p>El límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite. Y el límite de detección con base a la señal de ruido se calcula con la ecuación: $LD = (3.3 \times S_b) / b_1$</p>
<p>Especificidad</p> <p>Se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes presentes en la matriz de la muestra.</p>	<p>La respuesta del método solo se deberá al analito.</p>
<p>Robustez</p> <p>Capacidad del método analítico para mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método</p>	<p>Establecer factores instrumentales críticos, en cada condición de operación distinta, así como en la normal, analizar por triplicado. Calcular la media aritmética de la condición normal de operación (y_0) y de cada condición de operación diferente a la normal (y_1). Calcular la diferencia aritmética de cada condición respecto a la condición normal d_i</p> <p>$d_i \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos</p> <p>$d_i \leq 3\%$ para métodos químicos y espectrofotométricos</p> <p>$d_i \leq 5\%$ para métodos biológicos</p> <p>No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra</p>
<p>Tolerancia</p> <p>Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones a las normales</p>	<p>Se deben establecer los factores ajenos al método que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso y analizar una misma muestra por triplicado en cada condición.</p> <p>Calcular la media aritmética (y), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV)</p> <p>El CV del porcentaje de recobro debe ser no mayor a: 2% para métodos cromatográficos y volumétricos y no mayor a 3% para métodos químicos o espectrofotométricos</p> <p>La tolerancia debe ser no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra</p>

CAPÍTULO 5

COMPARACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO SÓDICO EN FORMAS FARMACÉUTICAS

5.1 Cronología de técnicas reportadas para la determinación de diclofenaco sódico

A continuación se presentan algunos métodos que han sido publicados en la hemerografía para la cuantificación de diclofenaco sódico en formas farmacéuticas y fluidos biológicos, se prestó especial interés en la búsqueda de técnicas que se realizaron en la última década. Sólo se citaron un par de técnicas en las que se evaluó el diclofenaco sódico cualitativamente: Voltametría⁵⁶ y detección electroquímica de diclofenaco sódico⁷⁴

Tabla 5. Cronología de técnicas reportadas para cuantificación y determinación de diclofenaco sódico en medicamentos y fluidos biológicos

Año	Método	Tipo de muestra
1977	Cromatografía de gases ¹⁴	plasma o suero
1980	Cromatografía de gases con detección por captura de electrones ¹⁹	orina y plasma
1988	Espectrofotometría ultravioleta, utilizando Na NO ₂ ²³	tabletas
1989	Espectrofotometría visible con violeta de metileno ²⁴	tabletas y cápsulas
1991	Espectrofotometría visible aplicado al complejo: diclofenaco – cobre II ²⁵	tabletas
1993	Espectrofotometría visible, vía reacciones de oxidación (sulfato cérico amónico, dibromo-dimetil-hidantoína y N-bromosuccinimida) ²⁶	tabletas y ampolleta
	Espectrofotometría ultravioleta ²⁷	tabletas
1994	Colorimetría ³⁹	tabletas
	Cromatografía en capa fina ⁴¹	tabletas
1995	Espectrofotometría visible, utilizando azul de metileno ²⁸	tabletas
	Espectrofotometría ultravioleta, para identificación simultánea de diclofenaco, clorzoxazona y paracetamol ²⁹	tabletas
	Cromatografía líquida de fase reversa ⁵⁹	plasma humano
1996	Espectrofotometría ultravioleta para determinación simultánea de diclofenaco y paracetamol ³⁰	tabletas
	Espectrometría de masas/ cromatografía de gases /monitoreo de ion selectivo ⁵⁷	plasma humano
1997	Espectrofotometría ultravioleta con flujo de extracción ³¹	tabletas
	Espectrofotometría ultravioleta para estimación simultánea de diclofenaco de sodio, clorzoxazona y paracetamol ³²	tabletas
	Colorimetría para antiinflamatorios no esteroideos usando p-dimetil-aminocinamaldehído ⁴⁰	tabletas, cápsulas, ampolletas
1998	Absortimetría ultravioleta de fase sólida ³³	tableta, ampolleta
	Espectrofotometría visible, por inyección de flujo utilizando 3 metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidroclicórica ⁶⁸	orina, tableta, ampolleta, supositorio
	Cromatografía líquida de alta resolución y detección electroquímica para determinación de diclofenaco y oxibuprocaína ⁷⁴	humor acuoso humano
1999	Espectrofotometría ultravioleta para análisis de diclofenaco, paracetamol y clorizanona ³⁴	tabletas
	Espectroscopía de fase sólida ⁵⁴	tabletas
	Electroforesis capilar ⁵⁵	tabletas
	Cromatografía de gases/espectrometría de masas/ monitoreo de ion selectivo ⁵⁸	plasma humano

2000	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa ²¹	supositório
	Calorimetría diferencial de barrido ⁵²	tabletas, ampollitas, supositorios
	Cromatografía líquida de alta resolución para determinación de diclofenaco y aceclofenaco ⁶⁰	plasma humano
	Electroforesis de zona capilar con detección electroquímica ⁶⁵	orina humana
	Espectrofluorimetría: diclofenaco en presencia de ciclodextrinas ⁶⁷	tabletas
2001	Espectrofotometría ultravioleta con inyección de flujo para diclofenaco y ácido mefenámico ³⁵	tabletas
	Cromatografía de líquidos de alta resolución ⁴³	parches transdérmicos
	Cromatografía líquida/ionización atmosférica química/espectrometría de masas, para determinación de diclofenaco, ácido flufenámico, indometacina y ketoprofeno ⁴⁴	tabletas y cápsulas
	Cromatografía líquida de alta resolución previa extracción en fase sólida ⁶¹	plasma humano
2002	Potenciometría y fluorimetría ³	tabletas, ampollita y supositorio
	Cromatografía líquida de fase reversa para determinación simultánea de diclofenaco sódico, metilparabeno y propilparabeno ⁴⁵	gel tópico
	Cromatografía de capa fina de alta resolución ⁶⁴	suero humano
2003	Cromatografía líquida: relevancia de CYP2C9 ¹⁷	fluido sinovial humano
	Cromatografía de líquidos de alta resolución ⁶²	orina humana
2004	Espectrofotometría ultravioleta para caracterización de factores que afectan la baja solubilidad en tabletas de liberación prolongada ³⁶	tabletas de liberación controlada
	Espectrofotometría ultravioleta para tabletas que contienen diclofenaco y vitamina B ³⁷	tabletas
	Espectrofotometría visible para determinación simultánea de diclofenaco y piroxicam ³⁸	tabletas
	Voltametría de diclofenaco ⁵⁶	tabletas
2005	Potenciometría ⁶⁹	orina, suero y tabletas
2006	Cromatografía de capa fina de alta resolución para la determinación simultánea de diclofenaco y paracetamol ⁴²	tabletas
	Potenciometría ⁴⁹	tabletas, ampollitas
	Fotometría de reflectancia difusa ⁵¹	tabletas, ampollitas
	Cromatografía de líquidos de alta resolución/ espectrofotometría ultravioleta para determinar diclofenaco y 4-OH' diclofenaco ⁶³	suero de rata
	Electroforesis capilar con detección electroquímica ⁶⁶	suero
	Potenciometría de electrodos de ion selectivo, basada en hierro porfirinas ⁷⁹	tabletas
2007	Cromatografía líquida para diclofenaco y rabeprazol sódico ⁴⁶	tabletas
	Potenciometría ⁵⁰	tabletas
2009	Cromatografía líquida de alta resolución para ibuprofeno, diclofenaco y ácido salicílico ⁴⁷	orina
	Cromatografía líquida de alta resolución ⁴⁸	colirio

5.2 Comparación de métodos analíticos para la cuantificación de diclofenaco sódico en formas farmacéuticas.

Los métodos comúnmente utilizados en la cuantificación de diclofenaco en tabletas, ampollitas y supositorios son los métodos espectrofotométricos, cromatográficos, potenciométricos y fluorométricos, otros de menor uso son la fotometría de reflectancia difusa y la calorimetría diferencial de barrido. Cabe destacar que el método oficial para llevar a cabo la cuantificación de diclofenaco sódico en tabletas y ampollitas es la cromatografía de líquidos de alta resolución –según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 9ª edición-.

En éste estudio se realizó una revisión de los métodos hasta ahora reportados para la cuantificación de diclofenaco sódico en las formas farmacéuticas: tableta, supositorio y ampollita y se eligieron sólo aquellos métodos que contaban con suficientes datos de su validación para su comparación. Las técnicas que se descartaron por ésta razón fueron la fotometría de reflectancia difusa⁵¹ y la calorimetría diferencial de barrido⁵², en el primer caso por no acreditar su repetibilidad y reproducibilidad, pues aún cuando el límite de detección reportado es de 0.7 mg mL^{-1} , y en el análisis de muestras de tabletas y ampollitas se obtuvo una recuperación entre 96% y 99%, contrario a los métodos tradicionales de reflectancia donde un sólido en superficie es cuantificado, éste método corresponde a la cuantificación de un sólido suspendido en disolución, lo que aumenta el coeficiente de variación hasta un 4% debido a la dificultad de preparar una superficie reflejante rigurosamente homogénea; en el caso de la calorimetría diferencial de barrido por no aportar más datos sobre la validación del método salvo la recuperación obtenida para tabletas, ampollitas y supositorios, que fue de 101.64%, 102.41% y 100.61% respectivamente. En el caso de parche transdérmico⁴³ y gel tópico⁴⁶ que contienen diclofenaco sódico, éste tipo de medicamentos sólo se han cuantificado por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, en el caso de colirio dicha técnica también se validó recientemente con excelentes resultados y no se han publicado métodos alternos.

A continuación se presenta una tabla comparativa de los métodos más utilizados, en su mayoría publicados en la última década y que presentaron mejores resultados con respecto a sus parámetros de validación en la recuperación de diclofenaco en muestras de ampollitas y tabletas.

Tabla 6. Comparación de parámetros de validación, ventajas y desventajas de métodos utilizados en la cuantificación de diclofenaco sódico en las formas farmacéuticas: tabletas y ampollitas.

Método	Espectrofotometría visible aplicada al complejo: diclofenaco-acetato de cobre ²⁵	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica ⁴⁴	Fluorométrico ³	Potenciométrico ⁴⁹
Rango lineal de conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	250-2000	50-300	0.30-30.00	15-15000
Coefficiente de correlación (r)	0.9990	0.9976	0.9995	0.994
Límite de detección ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	72.8	1.0	0.17	9.5
% Recuperación tabletas	98.5	100.9	100.6	101
% Recuperación ampollitas	---	---	99.33	99.6
% Desviación estándar relativa	1.73	7.6	1.82	1.2
Preparación de la muestra equipo y condiciones del método	Preparar una disolución de la muestra con concentración de 5.0 mg mL ⁻¹ de diclofenaco sódico, a 2 mL de ésta disolución agregar 3 mL de disolución de acetato de Cu ²⁺ (0.25 M), 1 mL de cloruro de potasio, 4 mL de disolución amortiguadora de acetatos y 5 mL de cloroformo. Agitar 10 min, ajustar la fuerza iónica a 0.18 M y el pH 6.0, con un embudo de separación separar la capa clorofórmica. Leer la absorbancia a 680 nm, utilizar un espectrofotómetro con celdas de cuarzo de 10 mm.	El polvo de una tableta se transfiere a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de metanol, aforar y filtrar, preparar diluciones con la fase móvil: acetonitrilo, acetato de amonio (5:1 v/v), pH 7.4. Inyectar manualmente 10 μL en la columna GLC-CN (3-cianopropilpolisiloxano, tamaño de partícula de 5 μm de diámetro). Fijar la temperatura de vaporización en 200 +/- 1°C y velocidad de flujo 1 mLmin ⁻¹ . Temperatura de vaporización: 200 °C. El espectrómetro de masas debe ser operado en el modo APCI negativo y programado para admitir moléculas deprotonadas [M-H] ⁻ a (m/z) de 295.9.	Pesar un peso equivalente a 16 mg de diclofenaco, disolver en 50 mL de disolución amortiguadora de acetatos, llevar a una concentración de 0.75 mg mL ⁻¹ . Agitar la disolución 30 min. Fluorómetro equipado con un filtro de excitación a 305-395 nm y un filtro de emisión 430-470 nm. La irradiación a 254 nm se consumió con una lámpara de mercurio de baja presión. Se seleccionó el puerto 1 ^{ref. 2} y fijado con la disolución muestra Velocidad de flujo a 7.9 mL min ⁻¹ . La intensidad de señal es mejor a pH >9	Pesar un peso equivalente de diclofenaco de 30 mg, agregar agua, ajustar la fuerza iónica a 0.5 M con Na NO ₃ y pH a 7, aforar a 100 mL, emplear una alícuota de 25 mL para el análisis Metro-ion/pH. Preparación del electrodo indicador mercurio (I): 1.4 g de mercurio (I)-diclofenaco y 0.2 g de mercurio metálico, añadir polvo de grafito 0.7g mezcla homogénea, comprimir a 8 t por 5 min, la pildura se fijó a un tubo de vidrio con silicón, se dejó secar por 48 h. El electrodo de referencia es un Ag AgCl.
Ventajas y desventajas del método	Equipo y reactivos de bajo costo, práctico y de uso simple Preparación simple de la muestra Útil para el análisis de rutina Alta sensibilidad	Equipo sofisticado de costo elevado Preparación simple de la muestra Útil para el análisis de rutina Alta sensibilidad	Equipo de bajo costo Preparación simple de la muestra Útil para el análisis de rutina Alta sensibilidad	Útil en análisis de rutina. Hasta 33 muestras por hora Determinaciones simples El límite de detección del electrodo permiten alcanzar concentraciones del orden de una fracción de ppm Previo a toda determinación hay que considerar las posibles interferencias.

CAPÍTULO 6

COMPARACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO SÓDICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Para la cuantificación de diclofenaco sódico en fluidos biológicos, las técnicas hasta ahora reportadas son: cromatografía de gases con detector por captura de electrones y acoplada a espectrometría de masas^{15,57-58}, cromatografía líquida de alta resolución tanto en fase normal, como en fase reversa^{17,59-63}, cromatografía en capa fina⁶⁴, electroforesis de zona capilar con detección electroquímica⁶⁵⁻⁶⁶ y fluorimetría⁶⁷.

En la tabla 7 se hace una comparación de la aplicación del método cromatografía de líquidos de alta resolución contra el método cromatografía en capa fina de alta resolución único método que fue publicado en la última década y que presenta mejores resultados en eficiencia de extracción con respecto a técnicas publicadas con anterioridad como la cromatografía de gases con detector por captura de electrones. En la determinación y cuantificación de diclofenaco sódico en muestras de plasma.

En la tabla 8 se comparan técnicas reportadas recientemente, para la cuantificación de diclofenaco sódico en muestras de orina, tales como potenciometría y cromatografía líquida de alta resolución con microextracción en fase líquida contra el método cromatografía líquida de alta resolución, cabe señalar que ninguno de los tres métodos reportó datos de desviación estándar relativa, o coeficiente de variación, por lo que la comparación entre las técnicas sólo se realizó observando el porcentaje obtenido en la recuperación de diclofenaco sódico, la practicidad y economía de dichas técnicas.

Tabla 7. Comparación de métodos analíticos utilizados en la cuantificación de diclofenaco sódico en plasma

Método	Cromatografía de líquidos alta resolución ⁶¹	Cromatografía en capa fina de alta resolución ⁶⁴
Rango lineal (ng mL ⁻¹)	----	200-800
Coefficiente de correlación	0.999	0.9876
Límite de cuantificación (ng mL ⁻¹)	5.00	120
Límite de detección (ng mL ⁻¹)	1.20	90
% Recuperación	>92	78
% Coeficiente de Variación	----	3.2
<p>Equipo y condiciones de la técnica</p> <p>Volumen de muestra: 1 mL de plasma humano</p>	<p>Posterior a la aplicación de parche transdérmico con diclofenaco sódico.</p> <p>A 1 mL de plasma, añadir 20 µL de estándar interno (5 mg mL⁻¹ de metanol) y 100 µL de HCl 7M , 1 mL agua. Centrifugar a 4000 rpm , 10 min</p> <p>Agregar 200 µL de metanol seguido de 200 µL de una mezcla de metanol-acetonitrilo-etilacetato (35:35:30v/v/v)</p> <p>Tiempo de retención: 5.87</p> <p>Volumen de inyección 100 µL</p> <p>Columna de fase reversa C₁₈ (octadecil-silano enlazado químicamente a sílica porosa tamaño de partícula de 5 µm)</p> <p>Dimensiones: 250 mm X 4.6 mm y 5 µm diámetro interno, eluída en modo isocrático con mezcla de fosfato ácido de potasio (25 mM, pH 3.5) acetonitrilo (30/70 v/v) Velocidad de flujo 1 mL min⁻¹ Detección a 280 nm</p>	<p>Posterior a la administración de 1 tableta de 100 mg de liberación prolongada.</p> <p>Realizar una extracción con acetato de etilo. Utilizar placas recubiertas con sílica gel, usar jeringa de 100 µL para la aplicación de la muestra y del estándar.</p> <p>Fase móvil: tolueno/ acetona/ ácido acético glacial (80:30:1 v/v/v)</p>
<p>Ventajas y desventajas del método</p>	<p>Alta sensibilidad del equipo</p> <p>Límites de cuantificación y detección en 5 y 1 ng mL⁻¹ respectivamente</p> <p>Preparación simple de la muestra</p> <p>Ideal para muestreo rutinario. Hasta 24 muestras por hora</p> <p>Costo elevado</p>	<p>Baja eficiencia en la recuperación de la muestra</p> <p>Límites de cuantificación y detección en el orden de microgramos</p> <p>Muy bajo costo del equipo</p> <p>Fácil preparación de la muestra</p>

Tabla 8. Comparación de métodos analíticos utilizados en la cuantificación de diclofenaco sódico en orina

Método	Cromatografía líquida de alta resolución con extracción de fase líquida ⁴⁷	Potenciométrico ⁶⁹	Cromatografía líquida de alta resolución ¹⁷
Rango lineal de concentración (ng mL ⁻¹)	175-10,000	3000-3x10 ⁶	2000-16000
Coefficiente de correlación	0.9989	----	0.990
% Desviación estándar relativa	----	----	----
Límite de detección (ng mL ⁻¹)	53	1185	180
% Recuperación eliminación renal en 24 h	98	101-103	57
Equipo y condiciones de la técnica Administración oral única de una tableta de diclofenaco sódico de capa entérica	<p>Cromatógrafo líquido de alta resolución con una bomba cuaternaria y sistema de selección de diodo con detector de fluorescencia programable.</p> <p>Sistema controlado con un módulo interfase y computadora. La fase móvil consiste en 0.1 mL de ácido fórmico y metanol, el grado de elución se programó de 40-70% en 10 minutos.</p> <p>Velocidad de flujo 2.5 mL min⁻¹</p> <p>La fase extractante fue NaOH pH 10</p>	<p>Analizador ion pH/mV para lecturas de potencial a 25 °C.</p> <p>Un electrodo de Ag/AgCl fue usado como electrodo interno de referencia.</p> <p>Preparación del sensor con 32 mg de cloruro de polivinilo (PVC) en polvo y 2 mg de bromuro de hexadecil piridina, 6 mg de di-butil pftalato en 5 mL de tetrahidrofurano, la mezcla se colocó en un plato de vidrio de 2 cm de diámetro y se evaporó el disolvente hasta la obtención de un aceite en un tubo de polietileno de 5 mm de diámetro interno se introdujo la mezcla se llevó a una disolución de 1.0x10⁻² M de diclofenaco sódico, para su acondicionamiento por una hora.</p> <p>La disolución de trabajo de diclofenaco se preparó por dilución del estándar de diclofenaco 0.1 M</p> <p>El tratamiento en fluidos biológicos se realizó mediante la mezcla de 2.5 mL de diclofenaco sódico 0.001M y 2.5 mL de orina o suero en un volumen final de 10 mL con H₂O</p>	<p>HPLC con bombeo de disolvente y detector programable de UV fijo a 282. Separación cromatográfica a temperatura ambiente en columna de fase reversa Hypersil ODS (octadecil-silano enlazado químicamente a sílica porosa tamaño de partícula de 5 µm) Dimensiones: 250X4.6 mm y 5 µm diámetro interno.</p> <p>Fase móvil: mezcla de acetonitrilo-metanol-tetrahidrofurano-agua (22:10:3:65 v/v). Velocidad de flujo a 0.8 mL min⁻¹</p> <p>Hidrólisis alcalina de 500 µL de orina, 100 µL de NaOH (5 M) incubar a 72 °C 1 hr añadir 50 µL de flurbiprofeno (125 ng/L) y 1 mL de HCl (2M).</p> <p>Extracción con 5 µL de isopropil éter, centrifugar 10 min, evaporar la capa orgánica a sequedad en torrente de nitrógeno por 30 min. Resuspender en 200 µL de la fase móvil, volumen de inyección 20 µL</p>
Ventajas y desventajas del método	<p>Alta sensibilidad del equipo</p> <p>Límites de cuantificación y detección en el orden de ng mL⁻¹</p> <p>Preparación simple de la muestra</p> <p>Ideal para muestreo rutinario</p> <p>Costo elevado</p>	<p>Alta sensibilidad del equipo</p> <p>Límite de detección en el orden de mg mL⁻¹</p> <p>Preparación simple de la muestra</p> <p>Preparación simple del electrodo</p> <p>Vida útil del electrodo aproximadamente 5 a 6 meses</p> <p>Útil en el muestreo de rutina</p> <p>Método económico</p>	<p>Menor eficiencia de recuperación en la muestra comparado con el método de microextracción</p> <p>Límite de detección en el orden de microgramos</p> <p>Preparación más elaborada de la muestra</p> <p>Puede utilizarse en el muestreo de rutina</p> <p>Costo elevado</p>

CAPÍTULO 7

ANÁLISIS DE RESULTADOS

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La primera técnica reportada para la cuantificación de diclofenaco sódico corresponde a cromatografía de gases en muestras plasmáticas a través de un método simple de extracción clorofórmica que alcanzó una eficiencia de extracción del 76 % en el año de 1977¹⁴. A este estudio sobrevinieron sólo unos cuantos reportes de análisis de fluidos biológico que también se llevaron a cabo por la misma técnica pero con una resolución pobre para diclofenaco de sodio y sus metabolitos, fue en 1980 cuando se reportó el método de cromatografía de gases con detección por captura de electrones en el que la eficiencia de recuperación mejoró notablemente alcanzando un 94%⁸⁰.

En la década de los 80, con la introducción del uso de diclofenaco sódico en tratamientos médicos, se inició la búsqueda de métodos de análisis para la detección y cuantificación de éste fármaco en formas farmacéuticas, que fueran simples y costeables, es a mitad de ésta década cuando se publican métodos espectrofotométricos para el análisis en formas farmacéuticas, obteniéndose a partir de éstos muy buenos resultados en cuanto a precisión, exactitud y simplicidad de la técnica, este es el caso de análisis espectrofotométricos utilizando reactivos como violeta de metilo²⁴, azul de metileno²⁸ amarillo de acridina³¹; o el reactivo aquí citado por ser unos de los métodos más populares para la cuantificación de éste fármaco, el acetato de cobre²⁵, para la formación de complejos con diclofenaco sódico.

La cuantificación de diclofenaco utilizando el reactivo acetato de cobre²⁵ alcanzó un límite de detección de $72.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ y recuperación de 98.5% con desviación estándar relativa de 1.73%. La respuesta de absorción fue lineal en relación a la concentración de diclofenaco en el rango de 0.25 a 2.00 mg mL^{-1} , y el coeficiente de correlación fue de 0.999 (n=8) indicando una excelente linealidad. La especificidad del método se evaluó observando interferencia de otros compuestos presentes en tabletas, comparando el espectro del complejo en la muestra y la disolución de referencia, los cuales resultaron idénticos. La precisión del método se determinó en tres diferentes concentraciones, la desviación estándar relativa varía de 1.31 a 2.98%, para concentraciones de diclofenaco sódico de 2.5 a 7.5 mg mL^{-1} .

Los métodos espectrofotométricos siguen siendo una alternativa económica para determinaciones rutinarias de éste compuesto, y tienen ventaja sobre otras técnicas más sofisticadas, porque requieren de menos cuidados.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas⁴⁴ ha sido utilizada en análisis clínicos y farmacéuticos proporcionando alta eficiencia en detección y caracterización de fármacos, permitiendo su detección a niveles muy bajos con alto grado de especificidad en tiempos de análisis relativamente cortos.

La inclusión de ionización por presión atmosférica ha mejorado la sensibilidad y robustez del uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, tanto la técnica de ionización por electrospray y ionización química atmosférica son modos de ionización suaves que producen iones moleculares positivos y negativos a partir de moléculas polares. Para éste experimento se utilizó una mezcla que además de diclofenaco sódico incluía ácido flufenámico, ketoprofeno e indometacina.

Utilizando análisis de regresión lineal, los valores del área de pico fueron lineales sobre los rangos de concentración elegidos, el coeficiente de correlación fue de 0.9990, el límite de detección fue de 1.0 ng y la desviación estándar relativa de 10%, el límite de cuantificación fue de 50 ng mL⁻¹. La exactitud expresada como porcentaje de desviación de la concentración nominal, está en el rango de 5.2 a 5.9. La precisión dentro de los días y entre días expresada como porcentaje de desviación estándar relativa fue de 0.8 a 5.8% y de 2.6 a 9.1 % respectivamente.

Los datos indican buena exactitud y precisión del método. La recuperación obtenida para diclofenaco sódico fue de 100.7± 3.4%. Esta técnica está recomendada para el análisis de rutina, pues no requiere de una extensa preparación de la muestra.

En el caso del método fluorométrico³, el diclofenaco presenta una excitación máxima a una longitud de onda de 279 nm. La irradiación por 30 segundos de una disolución micromolar de diclofenaco, genera una nueva banda de emisión a un máximo de fluorescencia de 420 nm y con una intensidad 485 veces mejor comparada con la que se obtiene sin irradiar, lo que se atribuye a la formación de fotoproductos que rinden una mayor intensidad de fluorescencia. El

tiempo de irradiación, el volumen de muestra inyectado, la velocidad de flujo y el pH de reacción producen diferencia significativa en la intensidad de señales.

El tiempo de irradiación mayor a 30 segundos disminuye la intensidad de fluorescencia, un pH mayor a 9 demuestra una mejor influencia en la reacción cinética.

La respuesta fue lineal en el rango de 0.30-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9995 mostrando excelente linealidad del método. El límite de detección para éste método se reportó como 0.17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el límite de cuantificación no se reportó y la desviación estándar fue de 1.82%. La recuperación en tabletas alcanzó un 100.6 % y en ampollas 99.3%. El flujo de muestreo es de 32 muestras por hora, por lo que éste método es recomendado para el análisis de rutina.

En el método potenciométrico⁴⁹, el electrodo Pt | Hg | Hg_2^{2+} (Diclofenaco)₂ | grafito, presenta buena linealidad en el rango de 15-150000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 6.5 y un límite de detección de 9.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El electrodo puede construirse de manera sencilla con materiales económicos, con un tiempo de respuesta entre 20 y 30 segundos y puede ser usado por un periodo de 6 meses. Tiene alta selectividad en presencia de diferentes sustancias, además de que tiene buena estabilidad, precisión y exactitud.

Los métodos potenciométricos y fluorométricos, han sido propuestos en la última década, la ventaja de los métodos potenciométricos sobre otros consiste en que estos no requieren de aparatos costosos o de difícil manejo y no usan volúmenes altos de reactivos orgánicos de alta pureza, la desventaja de los electrodos selectivos que están disponibles comercialmente para la identificación de éste fármaco, es que ofrecen tiempos de vida útil cortos, los citados en este estudio son electrodos de fácil preparación que ofrecen tiempos de vida útil más prolongados⁴⁹, además de que ya han sido comparados estadísticamente contra el método de referencia y no se encontraron diferencias significativas.

En el caso de la técnica fluorométrica es una técnica altamente selectiva pero requiere de extremo cuidado en el mantenimiento de variables como el pH.

De los métodos analíticos revisados para la cuantificación de diclofenaco sódico en plasma, la recuperación más baja se obtuvo con el método de cromatografía de capa fina de alta

resolución⁶⁴ (78%) con coeficiente de correlación de 0.987% y límites de cuantificación y detección de 120 y 90 ng respectivamente el coeficiente de variación es de 3.2%, la técnica es simple y económica, mientras que el método de cromatografía de líquidos de alta resolución⁶¹ reportó un coeficiente de correlación de 0.999 y límites de cuantificación y detección de 5.0 y 1.2 ng mL⁻¹ respectivamente y recuperación mayor a 92%, tras la administración oral de una tableta de 50 mg de diclofenaco en el primer caso y tras la aplicación de parche transdérmico en el segundo.

Las muestras de orina son matrices complejas, que usualmente requieren de un previo procedimiento previo de limpieza y la mayoría de los métodos de análisis presentan valores de precisión pobre, sin embargo el método de cromatografía líquida de alta resolución con microextracción de fase líquida⁴⁷, es una buena alternativa para la pre-concentración de diclofenaco en orina humana, ya que alcanzó una recuperación de diclofenaco del 98% con un límite de detección cuantificable en nanogramos y una excelente linealidad ($r= 0.9989$). La técnica en la que se desarrolló un sensor potenciométrico también reporta muy buena recuperación del principio activo, entre 101 y 103%, pero el límite de detección de éste, está calculado en miligramos. Todos los métodos comparados son recomendables para el análisis de rutina.

Aún cuando la cromatografía de líquidos de alta resolución¹⁷ también presenta buena linealidad y un límite de detección en nanogramos, la recuperación obtenida por éste método fue de sólo 57%. Las principales ventajas del método potenciométrico⁶⁹ con respecto a las técnicas antes citadas, son su alto grado de recuperación de diclofenaco sódico (entre 101-103%), su economía y la facilidad con la que el sensor se puede preparar.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

Conclusiones

Equipos como el cromatógrafo de gases, cromatógrafo de líquidos de alta resolución, fluorómetro y analizador termogravimétrico, no son recomendables para el tratamiento de muestras a menos que se trate de un proceso de rutina, ya que son equipos costosos cuyo precio se encuentra por encima de 700 000 pesos y que requieren de mantenimiento y múltiples cuidados.

Los métodos espectrofotométricos a pesar de ser más económicos requieren en ocasiones de extensa preparación de la muestra, mientras que las técnicas más simples como la cromatografía de capa fina carecen de sensibilidad y exactitud, sin embargo, los métodos cromatográficos necesitan de extracción y derivatización previa a la detección.

Otra técnica económica es la potenciometría que en el caso particular de la fabricación de electrodos de cloruro de polivinilo que por medio de un complejo insoluble en agua, hexadecilpiridina-diclofenaco, demostró ser útil en la determinación de diclofenaco de sodio en muestras de tabletas, ampollitas, orina y plasma.

Todos los métodos aquí citados demostraron ser tan eficaces como el oficial, *cromatografía de líquidos de alta resolución*, por lo que la elección del método dependerá de las posibilidades económicas del laboratorio, el conocimiento del analista sobre el mismo, si se trata de un procedimiento de rutina o no, el grado de sensibilidad requerido; en el caso de muestras de medicamentos conteniendo este principio activo y que no pueden ser analizados por el método oficial, puede elegirse entre: espectrofotometría²⁵, fluorometría³ y potenciometría⁴⁹, que ofrecen límites de detección en microgramos por mililitro de muestra y cromatografía líquida acoplada a ionización química y espectrometría de masas que ofrece un límite de detección cuantificable en nanogramos, previa validación del método analítico.

En la cuantificación de diclofenaco sódico en plasma, el método de cromatografía líquida de alta resolución⁶¹ ofrece analizar hasta 24 muestras por hora, siendo el más rápido de los métodos que aquí se revisaron.

En el caso de la determinación de diclofenaco en muestras de orina, todos los métodos empleados ofrecen límites de detección en miligramos y nanogramos, pero el principal inconveniente del análisis de éste tipo de muestra es el pretratamiento para limpieza y pre-concentración de ésta, para obtener alta exactitud en la recuperación; sin embargo se han propuesto métodos como la cromatografía líquida de alta resolución con microextracción de fase líquida⁴⁷ que resuelve el problema del pretratamiento de la muestra o en el caso de que no se cuente con dicho equipo puede disponerse de métodos potenciométricos que aunque requieren una preparación más elaborada de la muestra, ofrece resultados equiparables respecto a la cromatografía de alta resolución.

Las técnicas que se descartaron de éste estudio por no contar con datos suficientes de validación fueron: la fotometría de reflectancia difusa⁵¹ y la calorimetría diferencial de barrido⁵², en el primer caso por no acreditar su repetibilidad y reproducibilidad, pues aún cuando el límite de detección reportado es de 0.7 mg mL^{-1} , y en el análisis de muestras de tabletas y ampollitas se obtuvo una recuperación entre 96% y 99%, contrario a los métodos tradicionales de reflectancia donde un sólido en superficie es cuantificado, éste método corresponde a la cuantificación de un sólido suspendido en disolución, lo que aumenta el coeficiente de variación hasta un 4% debido a la dificultad de preparar una superficie reflejante rigurosamente homogénea; en el caso de la calorimetría diferencial de barrido por no aportar más datos sobre la validación del método salvo la recuperación obtenida para tabletas, ampollitas y supositorios, que fue de 101.64%, 102.41% y 100.61% respectivamente.

En el caso de parche transdérmico⁴³, gel tópico⁴⁶ y colirio⁴⁸ que contienen diclofenaco sódico, éste tipo de medicamentos sólo se han cuantificado por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución y no se han publicado resultados en métodos alternos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. La falsificación y el robo de medicamentos octubre 2006 www.amiif.com.mx
2. Vargas Hernández Ivonne, Medicamentos pirata inundan al mercado, 02 diciembre 2010 www.cnnexpansion.com
3. Pimenta A. M., Araújo A. N. Montenegro M.C.B.S.M., Simultaneous potentiometric and fluorometric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system, *Analytica Chimica Acta* 470 (2002) 185-194
4. P. Moser, A. Sallman, I. Wiesenbergl., Synthesis and quantitative structure-activity relationships of diclofenac analogs, *J. Med. Chem.* 33 (1990) 2358-2368
5. A. R. Sallmann., *Am. Journal of Medicine.* The history of diclofenac, 80 (1986) 29-33
6. Kantor T.G., Use of diclofenac in analgesia, *Am. Journal of Medicine*, 80 (1986), 64-69
7. R.E. Small., Diclofenac sodium, *Clin. Pharm.* 8 (1989) 545
8. G. Giagoudakis., An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 897
9. Hart F.D., Huskisson E.C., Answell B.M., Non-steroidal anti-inflammatory analgesics. In: Hart F.D., ed. *Drug treatment of the rheumatic diseases.* 2nd ed. Balgowlah, NSW Australia: ADIS Press; 1982:7-60
10. Ihsan M. Kenawi, Barsoum N. Barsoum, Maha A. Youssef., Drug-drug interaction between diclofenaco, cetirizine and ranitidine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 655-661
11. Cryer B., Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase; a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediators.* 1998; 56:341-61

12. R. N. Brodgen, R.C. Heel, G.E. Pakes, T.M. Speight, G.S. Avery., Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin, *Drugs* 20 (1980) 24-48
13. J. C. Boylan, J. Cooper, Z.T. Chowhan., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, American Pharmaceutical Association, Washington, USA, 1986
14. Geiger U.P., Degen P.H., A. Sioufi., Quantitative assay of diclofenac in biological material by gas-liquid chromatography, *J. Chromatogr. III* (1975) 293-298
15. A. Schweizer, J. V. Willis, D. B. Jack, M. J. Kendall., Determination of total monohydroxylated metabolites of diclofenac sodium in urine by electron-capture gas-liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 195 (1980) 421-424
16. Todd P. A., Sorkin E. M., Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, therapeutic efficacy. *Drugs*. 1988; 35:244-85
17. Dorado Pedro, Berecz Roland, Cáceres Macarena C., Llerena Adrián, Analysis of diclofenac and its metabolites by high performance liquid chromatography: relevance of CYP2C9 genotypes in diclofenac urinary metabolic ratios, *Journal of Chromatography B*, 789 (2003) 437-442
18. J. A. Arancibia , G.M. Escandar., Complexation study of diclofenac with β -cyclodextrin and spectrofluorimetric determination, *Analyst* 124 (1999) 1833-1838
19. N. Gostick, I. G. James, T.K. Khong, P.Roy, P.R. Shepherd, A. J. Miller., Controlled-release indomethacin and sustained-release diclofenac sodium in the treatment of osteoarthritis – a comparative controlled clinical-trial in general-practice. *Curr. Med. Res. Opin.* 1990, 12, 135-142
20. Urs A. Boelsterli., Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology* 192 (2003) 307-322

21. Dimitrova Burya, Doytchinova Irini, Zlatkova Margarita., Reversed-phase high-performance liquid chromatography for evaluating the distribution of pharmaceutical substances suppository base-phosphate buffer system, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23 (2000) 955-964
22. Katzun, BG. *Farmacología Básica y Clínica*. 5ta ed. México, edit., El Manual Moderno; 1994, p. 582
23. Agrawal, Y.K.; Upadhyay, V.P.; Menon, S.K., Spectrophotometric determination of diclofenac sodium. *Indian J. Pharm. Sci.* jan-feb 1988, 50 (1) 58-60
24. C. S. P. Sastry, A. S. R. Prasad Tipirneni; M. V. Suryanarayana., Extractive Spectrophotometric determination of some; anti-inflammatory agents with methylene violet. *Analyst*, april 1989, 114, 513-515
25. S. Agatonovic-Kustrin, Lj. Zivanovic, D. Radulovic and M. Vasiljevic., Experimental design applied to a spectrophotometric study of a diclofenac sodium copper (II) complex. *Analyst*, july 1991, Vol 116, 753-756
26. Kamath B.V., Shivram K., Spectrophotometric determination of diclofenac sodium via oxidation reactions. *Anal. Lett.*, May 1993, 26 (5), 903-911
27. Fabre H., Sun S. W., Mandrou B., Maillols., H. Assay validation for an active ingredient in a pharmaceutical formulation: practical approach using ultra-violet spectrophotometry. *Analyst*, aug 1993, 118 (8), 1061-1064
28. Botello J. C. and Pérez Caballero G., Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene blue. *Talanta*, 42, No. 1, pp 105-108, 1995
29. Bhatia M.S., Dhaneshwar, S.R., Simultaneous spectrophotometric determination of diclofenac sodium, chlorzoxazone and paracetamol from combined dosage forms. *Indian Drugs* sep 1995, 32 (9), 446-450

30. Bhatia, M. S., Kaskhedikar S. G.; Chaturvedi, S. C., Three simple spectrophotometric methods for simultaneous estimation of diclofenac sodium and paracetamol from tablets. *Indian Drugs*, may 1996,33 (5),213-218
31. Pérez Ruiz T., Martínez Lozano G., Sanz A., San Miguel Ma. T., Flow extraction spectrophotometric method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 16 (1997) 249-254
32. Bhatia M. S., Kaskhedikar S. G., Chaturvedi S. C., Comparative evaluation of different spectrophotometric methods developed for simultaneous estimation of diclofenac sodium, chlorzoxazone and paracetamol from combined dosage forms. *Indian Drugs*, mar 1997,34 (3),149-153
33. Fernandez de Cordova M. L., Ortega Barrales P., Molina Diaz A., Sensitive and selective determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by solid phase ultraviolet absorptiometry, *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 263-268
34. Gangwal S., Trivedi, P., Analysis of multicomponent formulations containing diclofenac sodium, paracetamol and chlormezanone in tablet dosage forms. *Indian Drugs*, nov 1999, 36 (11), 683-686
35. Garcia, S., Sanchez-Pedreno, C., Albero I., Garcia C., Flow-injection Spectrophotometric determination of diclofenac or mefenamic acid in pharmaceuticals. *Mikrochim. Acta*, 2001,136 (1-2), 67-71
36. Kincl. M., Vrecer F., Veber M., Characterization of factors affecting the release of low-solubility drug from prolonged release tablets. *Anal. Chim Acta*,23 jan 2004,502 (1); 107-113

37. Sena M. M., Chaudhry Z. F., Collins C. H., Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 19 nov 2004,36 (4), 743-749
38. El-Didamony A. M., Amin A. S., Adaptation of a color reaction for spectrophotometric determination of diclofenac sodium and piroxicam in pure form and in pharmaceutical formulations. *Analytical Letters* 37, No. 6, pp 1151-1162, 2004
39. Mathur S. C., Kumar Y., Prasad P. B. N., Rao A. C. S., A simple colorimetric estimation of diclofenac sodium in dosage forms, *Indian Drugs*, sep 1994,31 (9),447-448
40. El Sherif Z. A., M. I. Walsh, M. F. EL-Tarras and Afaf O. Osman., Colorimetric determination of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using p-dimethylaminocinnamaldehyde. *Analytical Letters*, 30 (10), 1881-1896 (1997)
41. Sun, S. W., Fabre, H., Practical approach for validating the TLC assay of an active ingredient in a pharmaceutical formulation *J. Liq. Chromatogr.* Jan 1994, 17 (2),443-445
42. Dighe V. V., Sane R. T., Menon S. N., Tambe H. N., Pillai S., Simultaneous determination of diclofenac sodium and paracetamol in a pharmaceutical preparation and in bulk drug powder by high-performance thin-layer chromatography, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, nov-dec 2006,19 (112) 443-448
43. J. Klimes, J. Sochor, P. Dolezal, J. Korner., HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations, *International Journal of Pharmaceutics* 217 (2001) 153-160
44. Abdel-Hamid Mohammed E., Novotny Ladislav, Hamza Hoda., Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24 (2001) 587-594

45. R. Hajková, P. Solich, M. Pospílová, J. Sícha., Simultaneous determination of methylparaben, sodium diclofenac and its degradation product in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* 467 (2002) 91-96
46. Asfak V., Mrinalini D., Leena B., Rahul G., Simultaneous determination of diclofenac sodium and rabeprazole sodium in bulk and pharmaceutical dosage form by LC, *Chromatographia*, dec 2007 66 (11/12), 941-943
47. María Ramos Payán , Miguel Angel Bello López, Rut Fernández Torres., HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HP-LPME), *Analytica Chimica Acta* 653 (2009) 184-190
48. Caridad Margarita García Peña, Diana Pereda Rodríguez, Ania González Cortezón; Yanet Montes de Oca Porto., Determinación de diclofenaco de sodio por cromatografía líquida de alta resolución en un colirio al 0.1%, *Revista cubana Farm* 43-3 c.d. de la Habana, sep-nov 2009
49. Santini A. O., Pezza H. R., Pezza L., Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix, *Talanta* 68, 2006, 636-642
50. Maleki R., Martin A. A., Hosseinzadeh R., Jouyban A., PVC membrane sensor for diclofenac: applications in pharmaceutical analysis and drug binding studies, *Pharmazie*, 1 sep 2007,62 (9),672-677
51. Tubino Matthieu, Leandro de Souza Rafael., Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry, *Talanta* 68 (2006) 776-780
52. Bucci R., Magrì A. D. and Magrì A.L., DSC in the Chemical analysis of drugs, determinanation of diclofenac pharmaceutical formulations, *Journal of Termal Analysis and Calorimetry*, Vol. 61 (2000) 369-376

53. Fernandez de Cordova M. L., Ortega Barrales P., Molina Diaz A., Sensitive and selective determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by solid phase ultraviolet absorptiometry, *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 263-268
54. Ortega Barrales, P., Ruiz Medina A., Fernandez- de Cordova, M .L. Molina Diaz A., Sensitive and simple determination of diclofenac sodium by use of a continuous flow-injection procedure with solid-phase spectroscopic detection, *Anal. Sci*, oct 1999,15 (10),985-989
55. Prado M. S. A., Steppe M., Tavares M. F. M., Kedor-Hackmann E. R. M., Santoro M. I. R. M., Method validation for diclofenac sodium in pharmaceuticals by capillary electrophoresis, *J. Capillary Electrophor*, may-aug 1999, 6 (3-4), 125-129
56. Blanco Lopez M. C., Fernandez Llano L., Lobo-Castanon M. J., Miranda Ordieres A. J., Tunon Blanco P., Voltammetry of diclofenac at graphite, carbon composite and molecularly imprinted polymer-composite electrodes, *Anal. Lett.* Mar 2004,37 (5), 915-927
57. Borenstein M. R., Xu Y., Cooper S., Tzeng Tsang-Bin., Sensitive capillary gas chromatographic-mass spectrometric-selection monitoring method for the determination of diclofenac concentrations in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 685 (1996) 59-66
58. Choi M. H., Choi Y. K., Chung B. C., Rapid and sensitive analysis of diclofenac in human plasma by GC-SIM MS, *Analytical letters*, 32 (11), 2245-2253 (1999)
59. Li K., Zhao F. L., Yuan Y. S., Tan L., Determination of diclofenac sodium in human plasma by reversed-phase liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, Jun 1995, 18 (11), 2205-2216
60. Lee, H. S., Jeong, C. K., Choi S. J., Kim B., Lee M. H., Ko G. I., Sohn D. H., Simultaneous determination of aceclofenac and diclofenac in human plasma by narrowbore HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oct 2000, 23 (5), 775-781

61. Arcelloni Cinzia, Lanzi Roberto, Pedercini Silvia, Molteni Giulia, Fermo Isabella Pontiroli Antonio, Paroni Rita., High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid phase extraction, *Journal of Chromatography B* , 763 (2001) 195-200
62. Roskar R., Vojko K., Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid, *Journal of Chromatography B*, 788 (2003) 57-64
63. Kaphalia L., Kaphalia B. S., Kumar S., Kanz M. F., Treinen-Moslen, M., Efficient high performance liquid chromatograph/ultraviolet method for determination of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in rat serum, *J. Chromatogr., B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 18 Jan 2006, 830 (2), 231-237
64. Lala L. G., D' Mello P. M., Naik S. R., HPTLC determination of diclofenac sodium from serum, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002) 539-544
65. Jin W. R., Zhang J., Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection, *J. Chromatogr., A*, 28 Jan 2000,868 (1),101-107
66. Ding Y. S., Garcia C.D., Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in serum by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electroanalysis* (N. Y.), Nov. 2006,18 (22),2202-2209
67. Arancibia J. A., Boldrini A., Escandar G. M., Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of alfa-cyclodextrin, *Talanta*,21 Jun 2000,52 (2),261-268
68. García M. S., Albero M. I., Sánchez P. C., Molina J., Flow-injection spectrophotometric determination of diclofenac sodium in pharmaceuticals and urine samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17 (1998) 267-273

69. Mojtaba Shamsipur, Fahimeh Jalali, Sohrab Ershad., Preparation of a diclofenac potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis and to drug recovery from biological fluids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 943-947
70. Guía de la validación de métodos analíticos, del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, edición 2002
71. Martindale; Guía completa de consulta farmacoterapéutica, 2ª. Ed. Pharmaceutical Press, Barcelona 2005, pág 39-41
72. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, pág. 719-720
73. Chimenti Sergio, Santoianni P., Relapsed actinic keratosis evaluation (RAKE) study: Preliminary results after 4 months of treatment with 3% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel or cryotherapy *Journal of the American Academy of Dermatology* Vol 56, Issue 2, Supplement 2, february 2007, Pages AB152
74. Kuhlmann O., Stoldt G., Struck H., Krauss G., Simultaneous determination of diclofenac and oxybuprocaine in human aqueous humor with HPLC and electrochemical detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17 (1998) 1351-1356
75. Tonussi R.C., Ferreira S.H., Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization, *European Journal of Pharmacology*, 251 (1994) 173-179
76. Analytical profiles of drug substances, Vol. 19, Klaus Florey, pages 123-143
77. Farmacopea de lo Estados Unidos Mexicanos 9ª. Ed., México, 2008, pág. 948-950. MGA Cromatografía líquida de alta resolución, pág. 285-291. MGA Cromatografía plana, pág. 282-283. MGA Ultravioleta-visible, pág. 335-338
78. Lin Eng Ng, Hwee Ying Lim, Annette S. Vincent, Barry Halliwell, Kim Ping Wong, Nephrotoxicity of diclofenac, *Mitochondrion* Volume 6, Issue 5, October (2006); 13-14

79. Santos, E. M. G., Araújo A. N., Couto C. M., Potentiometric behaviour of ion selective electrodes base on iron porphyrins: The influence of porphyrin substituents on the response properties and analytical determination of diclofenac in pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42 (2006) 535-542
80. Branthwaite J. P., Nicholls A., Cyclosporin and diclofenac interaction in rheumatoid arthritis. *Lancet* (1991), 337,252
81. Härkönen M., Ekblom-Kullberg, S., Reversible deterioration of renal function after diclofenac in patient receiving triamterene *BMJ* (1986); 293, 698-699
82. Al-Balla S.R. The effects of cholestiramyne and colestipol on the absorption of diclofenac in man. *Int. J. Clin. Pharmacol Ther*, 32 (1994); 441-445
83. Skoog, A. Douglas, West, Donald M., Holler, J., Crouch S. R., *Fundamentos de Química Analítica*, 8va. Ed., México, 2007, 1014-1017
84. Rouessac, F., Rouessac, A., *Análisis Químico; métodos y técnicas instrumentales modernas*, Mc Graw Hill, España, 2003, pág. 137-155 y 198-208
85. Skoog A. Douglas, Leary James J., *Análisis Instrumental*, 4a. ed., México, 1994, 212-216
86. R. A. Day, Jr., A.L. Underwood, *Química Analítica Cuantitativa*, 6a. ed. Prentice Hall Hispanoamericana, México, 1991, 379-394