

21/10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE CE-
FADROXIL EN SUSPENSION POR CROMATOGRA-
FIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO

B I O L O G O

P R E S E N T A I

ADRIAN GARCIA GARCIA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE GENERAL.

	Pag.
1. INTRODUCCION.	1
2. GENERALIDADES.	3
2.1 Las Cefalosporinas.	3
2.2 Monografía del Cefadroxil.	4
2.3 Farmacología.	5
2.4 Métodos de análisis.	6
3. VALIDACION DE UN METODO ANALITICO.	26
3.1 Parametros a evaluar.	26
4. OBJETIVOS.	29
5. HIPOTESIS.	30
6. MATERIAL.	31
6.1 Reactivos	31
6.2 Equipo	31
7. PARTE EXPERIMENTAL.	33
7.1 Desarrollo del Método.	33
7.2 Evaluación de la Especificidad.	34
7.3 Evaluación de la Exactitud.	36
7.4 Evaluación de la Linealidad.	36
7.5 Evaluación de la Precisión.	37

	Pag.
8. RESULTADOS.	38
8.1 Especificidad.	38
8.2 Exactitud.	44
8.3 Linealidad.	44
8.4 Precisión.	45
9. CONCLUSIONES.	48
9.1 APENDICES.	51
9.2 BIBLIOGRAFIA.	55

1. INTRODUCCION.

Los antibióticos así como otros medicamentos deben ser administrados bajo una prescripción cautelosa y responsable, debido a que en concentraciones menores a las indicadas en su posología, los microorganismos pueden adquirir resistencia al antibiótico y en concentraciones mayores pueden ser tóxicos al organismo humano.

El cefadroxil es un antibiótico catalogado dentro del grupo de las cefalosporinas, dado que su estructura posee dos heterociclos fusionados, el principal de estos es el llamado anillo β -lactámico y el segundo es un anillo de seis miembros con un azufre dentro del anillo. ¹

Cualquier laboratorio que se aprecie de tener un control de calidad en sus productos de elaboración debe tener ciertas técnicas analíticas de cuantificación para así poder mantener una garantía en la calidad del producto, por lo que se hace necesario el desarrollo de un método analítico para la cuantificación del cefadroxil. Este tipo de métodos analíticos son de gran utilidad para mejorar o suplir técnicas que tengan un mayor tiempo de análisis a una menor precisión en los resultados. La evolución que ha tenido la instrumentación así como las

Técnicas en nuestros días ha tenido tal impacto, que se han tenido que desplazar las antiguas técnicas de análisis, por otro lado, los instrumentos o equipos de laboratorio se están fabricando con mayor precisión y están diseñados para disminuir el tiempo de análisis mediante métodos que han de ser desarrollados, éstos métodos deben ser validados para asegurar su precisión y reproducibilidad y así poderles dar un uso de rutina en el laboratorio.

Uno de los requisitos primordiales en los medicamentos, es su estabilidad física y química, así como el cuantificar el principio activo en presencia de sus excipientes. Debido a esta situación, en la actualidad se hace necesario contar con métodos analíticos que permitan cuantificar el principio activo en una formulación dada, ya que es de vital importancia medir la cantidad del activo durante el proceso de elaboración de la forma farmacéutica para mantener la cantidad autorizada por la Secretaría de Salud, así como las especificaciones del laboratorio.

La aplicación racional en instrumentación para cromatografía de líquidos de alta resolución, nos proporciona herramientas muy valiosas en el desarrollo de métodos analíticos, ya que nos permite contar con alternativas para la determinación de un compuesto específico, en identificación y cuantificación, con reproducibilidad, precisión y exactitud.

2.- GENERALIDADES

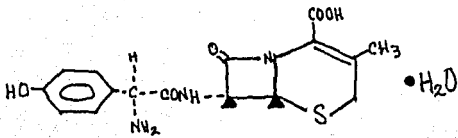
2.1 Las Cefalosporinas

Las cefalosporinas se clasifican en tres grandes grupos:

- 1). Cefalosporina P, activo solo contra gérmenes gram-positivos.
- 2). Cefalosporina N, un nuevo tipo de penicilina con una cadena lateral derivada del ácido D- α -aminoadípico, eficaz contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas.
- 3). Cefalosporina C, menos potente que la N, pero con el mismo campo de eficacia antimicrobiana; al aislar el núcleo activo de la cefalosporina C, ácido 7-aminocefalosporínico y con la adición de cadenas laterales, fué posible producir compuestos semisintéticos con actividad antimicrobiana mucho mayor que la de la substancia original.

Las cefalosporinas son agentes secundarios útiles y muchas veces constituyen la elección alternativa de la penicilina.^{2,3}

2.2 MONOGRAFIA DEL CEFADROXIL.



Fórmula condensada: C₁₆ H₁₇ N₃ O₅ S.H₂O 361.40

Nombre Químico: 5-*ti*-1-azabicyclo (4.2.0) oct-2-eno-2-ácido carboxílico-7-[Amino (4-hidroxifenil) acetil] amino-3-metil-6-oxo-monohidratado (6R-16 α, 7 β | R).

Ensayo: No menos de 900 mg y no más de 1050 mg de cefadroxil calculado sobre base anhidra, según USP XXI.

Identificación: El espectro de absorción ultravioleta exhibe un máximo a 264 nm.

Cristalinidad:	Polvo cristalino.
ph :	4.0-6.0
Agua :	4.2-6.0 %
Toxicidad :	Ningun ratón debe morir durante un periodo de 48 horas.
Solubilidad :	Soluble en agua, poco soluble en metano y cloroformo y benceno.
Apariencia :	Cristales blancos.
Punto de fusión :	197 °C ⁴ .

2.3. FARMACOLOGIA.

2.3.1 MECANISMO DE ACCION.

La cefalotina (Antibiótico que pertenece a las cefalosporinas) y similares, como el cefadroxil, inhiben la síntesis de la pared de la célula bacteriana.

2.3.2 ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, DESTINO, Y ELIMINACIÓN DEL CEFADROXIL.

Esta cefalosporina resiste los ácidos, en contraste con otras, se absorbe por el tubo digestivo; las concentraciones plasmáticas máximas después de una hora de la ingestión del fármaco son aproximadamente de 9 y 18 mg / ml con dosis orales de 250 y 500 mg respectivamente. La ingestión de alimentos puede retardar la absorción, menos del 10 a 15 % del antibiótico está fijado a la proteína plasmática y las concentraciones - - - - -

angüneas del mismo disminuyen rápidamente es de unos 40 minutos. - -
 Más del 90 % del fármaco se elimina sin alteración por la orina en plazo de 6 horas, básicamente por secreción tubular. La concentración máxima de cefadroxil en la orina puede pasar de 1 mg / ml después de una dosis de 250 mg, y todavía se descubren concentraciones terapéuticamente eficaces en la orina de pacientes con función renal disminuida. El cefadroxil es eliminado eficazmente de la circulación por hemodilísis o diálisis -- peritoneal.

2.4 METODOS DE ANALISIS.

Existen algunos métodos para la determinación del cefadroxil, pero éstos se agrupan en tres grandes grupos: químicos, biológicos y microbiológicos.

Los métodos Biológicos son demasiado tediosos y de un costo elevado por el hecho de tener que trabajar con animales de laboratorio (conejoratosnes, etc.) ya que éstos necesitan de cuidados muy especiales así como de instalaciones y materiales adecuados y costosos.

Los métodos Microbiológicos requieren de un mayor tiempo debido a que se manejan microorganismos, a éstos se les debe tener un cuidado especial dado que son muy sensibles a muchos cambios, como pueden ser temperatura, humedad, medio de cultivo y pH, además de que se requiere de áreas sanitizadas para evitar contaminaciones, sin tomar en cuenta la capacitación del personal para su buen manejo, sin embargo estos dos métodos

tienen buena sensibilidad, deben manejarse con sumo cuidado para obtener resultados confiables. Los métodos químicos también tienen buena sensibilidad pero son mucho más rápidos, además su reproducibilidad es mejor, se maneja con mayor facilidad y no es necesario tener instalaciones especiales.

2.4.1. MÉTODOS QUÍMICOS.

Dentro de los métodos químicos se encuentran dos con gran difusión en los análisis de laboratorio, hasta ahora el más utilizado es el yodométrico, sin embargo, actualmente se ha introducido otro método con mucho auge y gran aceptación: cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

2.4.1.1. MÉTODO YODOMÉTRICO.

El yodo es soluble en agua, sin embargo en presencia de yoduros solubles como el de potasio, aumenta su solubilidad por la formación del complejo triyoduro:



el ión triyoduro es la especie principal que existe en las soluciones de yodo, tanto en las utilizadas como reactivo valorante en métodos directos, como en las formadas por oxidación del ión yoduro en métodos indirectos.

Los oxidantes fuertes oxidan el I^- a I_2^- , los reductores fuertes reducen el I_2^- a I^- , por esta razón, los métodos se dividen en dos grupos:

a) Métodos directos, en donde se utiliza una solución patrón de yodo para valorar reductores fuertes, normalmente en soluciones neutras o débilmente ácidas.

b) Métodos indirectos, en donde los oxidantes se determinan haciéndolos reaccionar con un exceso de yoduro, el yodo liberado se valora en solución débilmente ácida con un reductor patrón como tiosulfato o arsénito sódico o potásico^{5,6}.

En los métodos donde se utiliza yodo existen dos fuentes principales de error:

a) El yodo desprende vapores haciéndolo volátil, por lo cual se pierde parte de él, esta fuente de error se minimiza añadiendo un exceso de yoduro potásico, para que se forme el complejo triyoduro, además las valoraciones con yodo, sean directas o indirectas no se efectúan nunca en caliente, ya que con ello incrementarían la pérdida del yodo por volatilización.

b) El ión yoduro se oxida con el oxígeno del aire, esta oxidación no es perceptible en solución neutra, pero se hace más apreciable a medida que aumenta la concentración del ión hidrógeno, la luz intensa acelera la oxidación atmosférica del ión yoduro y de la misma manera actúan algunos catalizadores, el agua que se utilice para la solución-

y para disolver el yoduro de potasio, debe estar recientemente hervida para eliminar el oxígeno disuelto y el yodo liberado debe ser valorado en ese instante.^{5,6}

2.4.1.2 METODO POR CLAR.

La cromatografía líquida es uno de los métodos analíticos más actuales, ampliamente utilizados por tener ventajas sobre otros métodos.

En general, los procesos cromatográficos pueden definirse como sigue:

Un método físico de separación en el cual los componentes a separarse se distribuyen entre dos fases; una de ellas en un lecho estacionario, mientras la otra se mueve por percolación a través de este lecho. Los procesos cromatográficos tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a los largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de separación o distribución de los distintos componentes de la muestra.

Existen varias maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna, basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación pueden enumerarse cuatro tipos:

a) Cromatografía de adsorción, la fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción - desorción.

b) Cromatografía de partición, la separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

c) Cromatografía de intercambio iónico, El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa generalmente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuerte será atralda hacia la superficie iónica, y por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La móvil es un tñmpo acuoso, en la que el p^H y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

d) Cromatografía de exclusión, se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular, por razones fundamentalmente históricas, esta técnica se llama también filtración sobre geles o cromatografía sobre geles, aunque en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un gel ^{7, 8}.

En la cromatografía en fase normal el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (p. ejemplo sílice) y la fase móvil es-

apolar (p. ejemplo hexano o tetrahidrofurano). las muestras polares - quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares. la cromatografía en fase inversa es exactamente la inversa. El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburos) mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente - agua o un alcohol, en este caso, cuanto más polar sea la muestra mayor será su velocidad de salida. ⁶.

la moderna cromatografía de líquidos, comparada con la cromatografía clásica, se caracteriza por:

- a) Columnas reutilizables de pequeño diametro (2 - 5 mm).
- b) Rellenos de columnas de partículas muy pequeñas (5 - 50 μ m). y descubriéndose nuevos materiales para usarlos como fase estacionaria.
- c) Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y detectar cantidades muy pequeñas.
- d) Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil.
- e) Instrumentos normalizados y automatizados.
- f) Análisis rápidos.
- g) Alta presión ^{7,8,9}.

2.4.2 FUNDAMENTOS BASICOS DE CLAR.

2.4.2.1 EL PROCESO DE SEPARACION.

Para entender el proceso de separación, veremos en primer lugar lo que ocurre con un único componente de la muestra, para simplificar le llamaremos soluto. Si inyectamos esta muestra en la corriente de la fase móvil al inicio de la columna, eventualmente saldrá por otro extremo. Si no existieran interacciones, puentes de hidrógeno, atracciones polares, fuerzas de Vanderwaall, etc, las moléculas del soluto se desplazarían a lo largo de la columna con la misma velocidad que la fase móvil; en otras palabras, saldrían de la columna cuando el volumen total de fase móvil - utilizado desde el instante de la introducción de la muestra fuese igual al volumen vacío, o volumen intersticial, V_c , de la columna; sin embargo debido a las interacciones, las moléculas de la muestra saldrán más tarde, es decir, se necesita para su elución un volumen de fase móvil mayor, al que llamaremos volumen de retención, V_R' , del soluto. En la cromatografía líquida se usan bombas de gran precisión para suministrar la fase móvil en un número predeterminado de unidades de volumen por período de tiempo, y la separación se registra por medio de instrumentos de medición que responden al tiempo transcurrido, no al volumen eluido. Por consiguiente, en la actualidad es más útil el concepto de tiempo que de volumen; en lugar de volumen de retención se usa el tiempo de retención, t_R' , y en lugar de volumen intersticial, el tiempo de trayecto de la fase-

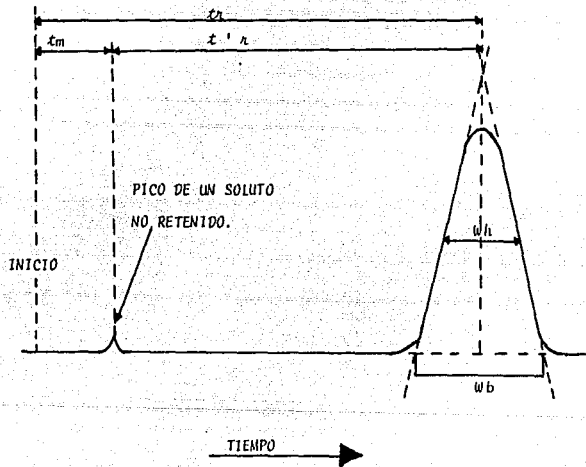


Figura 1. Un cromatograma típico.

Móvil, t_m' , que es el tiempo que usan las moléculas de la fase móvil para trasladarse desde un extremo hasta otro de la columna, para un flujo determinado.⁸

Considérese ahora una muestra formada por dos componentes, el primero es inerte respecto a la fase estacionaria, es decir, durante su paso a través de la columna sus moléculas permanecen siempre en la fase móvil y viajan siempre a su misma velocidad. El segundo componente de la muestra presenta un comportamiento cromatográfico corriente, interaccionado con la fase estacionaria. Observando el cromatograma obtenido por detección de las sustancias que emergen de la columna (ver figura 1) se aprecian dos picos, el primero (A) pertenece al compuesto inerte y el segundo (B), al soluto.

El tiempo de retención del soluto puede dividirse en dos partes, t_m y t_R , durante su paso a lo largo de la columna, las moléculas del soluto invierten parte del tiempo en la fase móvil y parte en la fase estacionaria, mientras están en la fase móvil se desplazan a la velocidad de la misma en tanto que mientras permanecen en la fase estacionaria están estáticas, ya que la fase estacionaria las retrasa; así, t_R' representa el tiempo que las moléculas del soluto permanecen en la fase estacionaria y se conoce con el nombre de tiempo de retención corregido, se expresa de la siguiente manera:

$$t'_R = t_R - t_m \quad \text{Donde: } t'_R = \text{Tiempo de retención corregido}$$

$$t_R = \text{Tiempo de retención}$$

$$t_m = \text{Tiempo muerto.}$$

2.4.2.2 FACTOR DE CAPACIDAD.

Es importante conocer cuántas veces es mayor el tiempo de retención corregido del soluto, tiempo durante el cual el soluto permanece en la fase estacionaria, que el tiempo invertido en la fase móvil, ya que el valor indica el tiempo durante el cual puede detenerse cada componente en la columna. La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo t'_R , mientras t_m representa el tiempo que permanece en la fase móvil; por tanto, el cociente entre ambos nos dará dicho valor, llamado relación o factor de capacidad, K :

$$K = \frac{t'_R}{t_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

conociendo la relación de capacidad, podemos calcular el tiempo de retención de un compuesto:

$$t_R = t_m (1 + K)$$

En la práctica hay que esforzarse por conseguir un valor de la relación de capacidad por lo menos igual a uno para el primer pico de interés, con el fin de asegurar su separación del disolvente y sus posibles impurezas, las cuales generalmente se eluyen a un tiempo igual o muy próximo a t_m . Tampoco interesa tener picos con un valor de K superior a 10 - 6 15 porque en este caso el tiempo de análisis sería demasiado largo, - además, la anchura del pico aumenta al aumentar la relación de capacidad - haciendo más difícil la resolución y la detección. ⁸

2.4.2.3 CARACTERISTICAS DEL PICO CROMATOGRAFICO.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el pico cromatográfico corresponde, de manera ideal, a una curva de distribución normal, dicha curva se caracteriza por su desviación estándar. La anchura del pico en cualquier punto, puede expresarse en múltiplos de la desviación estándar. La fig. 2 indica las anchuras del pico características, siendo útiles las tres siguientes:

- a). W_b , Anchura de la base de pico, que se obtiene trazando las tangentes en los puntos de inflexión y midiendo la longitud de la línea de base que queda comprendida entre los puntos que la cortan las tangentes.
- b). W_h , Anchura del pico medida al 50% de la altura total, o anchura del pico a media altura.
- c). W_i , Anchura medida en los puntos de inflexión, es decir, a una altura igual 60.7% de la total.

Los otros dos valores característicos de un pico cromatográfico son su área y altura. El área de un pico, es decir, la integridad bajo el pico es proporcional a la cantidad de soluto (o a su concentración, según sea el modo de detección) y por tanto se utiliza para la cuantificación del análisis cromatográfico. La altura del pico se mide en su punto máximo y corresponde a la máxima concentración de la zona. Por definición, los tiempos de retención se miden en este

punto (fig. 2), la altura del pico es proporcional a su área y en casos ideales pueden utilizarse también para la cuantificación de un cromatograma. Puesto que los picos de un cromatograma solamente en casos ideales corresponden exactamente a curvas de distribución Gaussiana, es preferible utilizar valores de áreas cuando se cuantifican.^{8,9}

2.4.2.4. NUMERO DE PLATOS TEORICOS

Desde este punto de vista de la separación cromatográfica, el ensanchamiento de las bandas en la columna debe evitarse tanto como sea posible, puesto que entre más anchos sean los picos menor número de ellos podrán resolverse en el mismo intervalo de tiempo, y por tanto podrán separarse menos componentes de la muestra. Por otra parte, si los picos son menos estrechos, la misma parte del cromatograma puede ocuparla en mayor número de picos y por tanto, en un tiempo dado puede separarse más componentes de la muestra. En otras palabras, cuanto más puntiagudos sean los picos, mejor es la columna.

La anchura del pico (es decir, la desviación estándar) indica también cuán agudo es el pico, sin embargo este valor también depende de varios parámetros; entre ellos, la velocidad de flujo, por tanto es mejor considerar un valor relativo para expresar la calidad del pico. Una expresión aparentemente adecuada es el cociente entre la desviación estándar (σ) y el tiempo de retención (T_R), también llamado desviación estándar relativa;

$$\sigma / T_R$$

Sin embargo, resulta ser un valor muy pequeño, y por tanto poco práctico, su inverso, se ha utilizado por diferentes científicos para la anterior expresión. En la práctica, lo que se utiliza para la expresión de la eficacia de una columna es el cuadrado del cociente anterior.

$$n = \left(T_R / \sigma \right)^2$$

La razón para el uso del cuadrado es teórica y está relacionada con el hecho de que desde un punto de vista matemático la medida básica de una distribución normal es la varianza, que es el cuadrado de la desviación estándar; el valor de "n" representa el número de platos teóricos. En la práctica el número platos teóricos se calcula usando la anchura de uno de los picos que pueda medirse directamente sobre el cromatograma. Sustituyendo las correspondientes expresiones de las ecuaciones de la fig. 2, el número de platos teóricos puede expresarse como:

$$n = 16 \left(\frac{T_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{ó} \quad n = 5.545 \left(\frac{T_R}{W_b} \right)^2$$

La última ecuación representa la forma común para expresar el número de platos teóricos.⁸

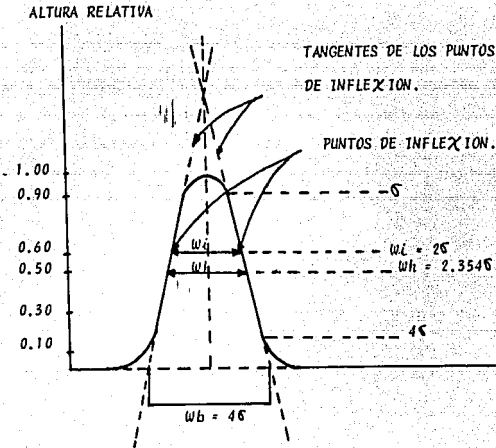


Figura 2. Anchuras características de un pico Gaussiano.

2.4.2.5 SEPARACION Y RESOLUCION.

Hasta ahora, solamente se ha considerado el caso en el que existe un pico único, sin embargo, en cromatografía se utilizan o se analizan muestras con muchos componentes y es de suma importancia la separación de los diferentes componentes.

La figura 3 muestra un cromatograma que presenta el pico del soluto no retenido y otros dos picos que salen muy cerca el uno del otro, independientemente del número de componentes de una muestra, el problema puede quedar siempre reducido al par de picos más difíciles de separar, por tanto debemos investigar la separación de dos picos adyacentes, pueden abordarse de dos maneras diferentes, en las cuales se describe la posición relativa de uno respecto al otro, o bien se indica el grado de resolución.

El factor de separación o retención relativa, α , describe la posición relativa de dos picos adyacentes, para su cálculo se utilizan los tiempos de retención corregidos, ya que la separación de los picos depende de la interacción selectiva con la fase estacionaria, es decir, el tiempo que permanecen en ésta fase, y no el tiempo que emplean en recorrer la columna a la velocidad de la fase móvil, así, para los picos A y B :

$$\alpha = \frac{T'_R (B)}{T'_R (A)} = \frac{K_B}{K_A}$$

Obsérvese que el valor que corresponde al pico que sale en el último lugar se coloca siempre en el numerador para asegurar un valor del factor de separación igual o mayor que 1.0, naturalmente, si α es igual a 1.0 los dos picos tienen tiempos de retención idénticos, en otras palabras, no existe separación.

El factor de separación expresa la posición relativa de los dos picos, pero no proporciona información alguna sobre la separación real de los picos, que dependen de lo puntiagudo que sean los picos, es decir, de la eficacia de la columna, como puede verse en la figura 4, que presenta 4 cromatogramas, los dos picos tienen un valor del factor de separación idéntico ($\alpha = 1.22$); sin embargo, la eficiencia de cada columna, es diferente

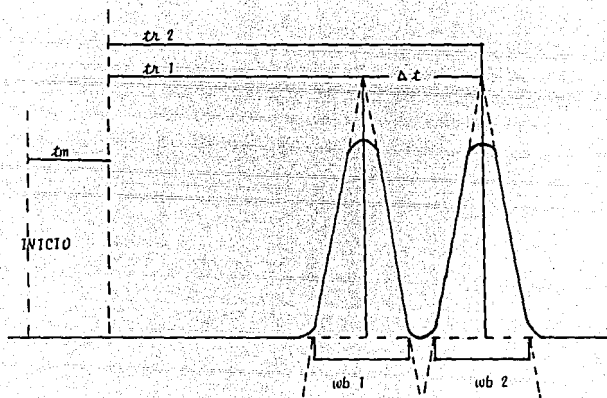


Figura 3. Cromatograma de un pico cercano a otro.

Y por tanto, la resolución de los picos, difieren en extremo.

Por convicción, la resolución (R_s o R) se expresa como el cociente entre la distancia de los máximos de los dos puntos (Δt) y el valor medio de la anchura del pico de la base ($\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}$)

$$R_s = \frac{\Delta t}{\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}} = \frac{2 \Delta t}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Si la resolución se calcula para dos picos muy cercanos, puede asumirse - que las anchuras de los dos picos son iguales, en este caso, la resolución del pico puede calcularse a partir de la distancia entre los puntos máximos de los dos picos y la anchura de la base del segundo pico. 7, 8, 9.

$$R_s \approx \frac{\Delta t}{w_{b2}}$$

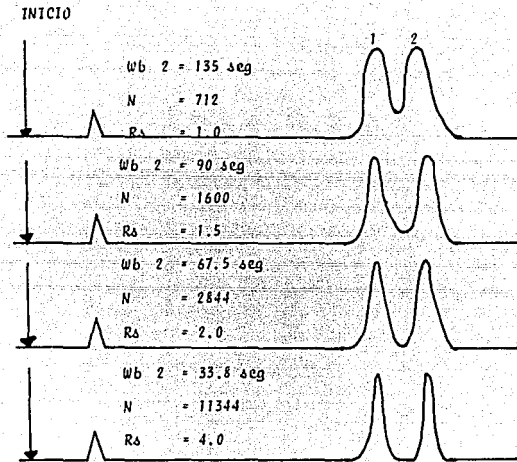


Figura 4. Cromatograma de dos picos con idénticos factores de separación pero diferentes resoluciones.

3. VALIDACION DE UN METODO ANALITICO.

Una variedad de experimentos han sido usados para validar un método, esta situación ocasiona una confusión e información heterogénea en los métodos de validación, debido a ésta situación se hace necesario establecer dos parámetros principalmente; primero establecer el número mínimo de experimentos, con los cuales sea suficiente para la validación del método; segundo, establecer los criterios a usarse para la validación del método. 10,11.

3.1 PARAMETROS A EVALUAR.

Cuando se desarrollan nuevos métodos analíticos, se hace necesario el conocimiento de la confiabilidad de los resultados obtenidos, esto nos lleva a la validación estadística de los siguientes parámetros: sensibilidad, exactitud, especificidad, linealidad y precisión. 10,11.

3.1.1. ESPECIFICIDAD.

Esta prueba nos reporta el grado en que los resultados obtenidos por el método están en función sólo por la substancia que se está determinando-

Y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en la forma farmacéutica analizada, como pudieran ser los excipientes o productos de degradación del principio activo. 10,11.

3.1.2 SENSIBILIDAD

Se entiende como sensibilidad a la capacidad que tiene el método para cuantificar la sustancia que se desea analizar (ejemplo. miligramos, etc.). 10,11,

3.1.3 EXACTITUD

Se entiende por exactitud a la concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia aceptado. Para la determinación de este parámetro se realiza un análisis de por ciento de recobro de formulaciones placebo cargados entre 50 y 120 % de la cantidad que se estipula en el marbete; el criterio que se utiliza es el estadígrafo de *t*-student para comparación de medias. 10,11.

3.1.4 LINEALIDAD

Este parámetro expresa el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y = a + bx$, donde $a = 0$ y $b = 1$, cuando se trabaja con diferentes concentraciones. Esto significa que se

Obtiene una línea alrededor de la cual se agrupan los puntos del diagrama de dispersión de las variables sometidas a estudio, se grafican las cantidades agragadas contra las cantidades encontradas y realizan una prueba de *t*-student, tanto para el intercepto como para la pendiente, obteniéndose también el grado de asociación entre las dos variables (coeficiente de correlación " r "), por otro lado se realiza el análisis de varianza para la carencia de ajuste, para determinar si el modelo de regresión lineal es el adecuado para el tratamiento de los datos. 10,11.

3.1.5. PRECISION

Se refiere a una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales con respecto a un valor central, expresado en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

a) Repetibilidad: para este caso se realiza la estimación de la desviación estándar de los datos experimentales, mediante la prueba de ji-cuadrada y se evalúa la significancia de la variabilidad.

b) Reproducibilidad: en este diseño se contemplan diferentes análisis así como diferentes días y para conocer su variabilidad se utiliza el análisis de varianza para dos factores aleatorios, este diseño consiste en desglosar las diferentes fuentes que contribuyen a la variabilidad del fenómeno probando la significación de cada fuente contra el error experimental, cuyo criterio de prueba es el cociente del estadígrafo de *F* de dos varianzas. 10,111.

4. OBJETIVOS

Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución que sea específico para cuantificar el cefadroxil en una formulación de suspensión oral.

4.2. Seleccionar las condiciones de trabajo así como determinar la técnica más viable para el método analítico seleccionado.

4.3. Asegurar el grado de confiabilidad del método determinando la especificidad, exactitud, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y sensibilidad del método.

4.4. Realizar una breve comparación entre el método yodométrico y el cromatográfico para valorar si el segundo puede ser utilizado como método de rutina en el laboratorio.

5. HIPOTESIS

Por medio del desarrollo de un método analítico utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, podremos encontrar un método confiable para la cuantificación de cefadroxil - en una suspensión oral.

6. MATERIAL

6.1 REACTIVOS

Agua destilada filtrada	HPLC
Acetonitrilo grado HPLC	J.T. BAKER
Metanol grado APLC	J.T. BAKER
Fosfato de potasio monobásico	J.T. BAKER
Cefadroxil monohidratado Std.	U.S.P.
Tiosulfato de sodio R.A.	MERCK
Yodo 0,1 N R.A.	MERCK
Acido clorhídrico R.A.	J.T. BAKER
Hidróxido de sodio R.A.	J.T. BAKER
Almidón R. A.	MERCK
Cloroformo R.A.	J.T. BAKER

6.2. EQUIPO

Bomba	WATERS ASS.
Inyector	WATERS ASS.
Integrador	WATERS ASS. MOD.
Detector LC Espectrophotometer	WATERS ASS. MOD.
	481.

Columna μ - Bondapak C 18 5 micras	WATERS ASS.
30 cm de longitud 3.5 mm diametro	
Centrifuga	PHILLIPS DRUCKER MOD. L - 708
Campana de flujo laminar	
Vibrador de ultrasonido	WATERS ASS.
Jeringa Hamilton	WATERS ASS.
Agitador mecánico	MEETLER.
Balanza analítica	MEETLER.
Matraces erlenmeyer	PVREX.
Matraces volumétricos	PVREX.
Vasos de precipitados	PVREX.
Pipetas graduadas	PVREX.
Pipetas volumétricas	PVREX.
Probetas	PVREX.
Buretas	PVREX.
Membranas HA 0.45 micras.	WATERS ASS.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 DESARROLLO DEL METODO.

Para el desarrollo del método se procede a encontrar las condiciones adecuadas bajo las cuales exista una separación del cefadroxil y de sus productos de degradación, los parámetros manejados para esta separación fueron:

- a) Extracción del principio activo. - (EN LA FASE MOVIL).
- b) Fase móvil. (METANOL, AGUA, ACETONITRICO).
- c) Longitud de onda. - (237 nm).
- d) Atenuación del registrador. -
- e) Atenuación del detector. - (0.5 A U F S).
- f) Volumen de inyección. - (15 μ L).
- g) Velocidad de carta. - (0.5 Pulgadas / Min.).
- h) Velocidad de flujo. - (0.9 ml / Min.).
- i) Temperatura de la columna. - (AMBIENTE).
- j) Tiempo de retención. - (9 min. APROXIMADAMENTE.).

Los parámetros se optimizaron hasta encontrar las mejores condiciones para la separación y cuantificación del cefadroxil de la suspensión, siguiendo el diagrama de flujo que se muestra a continuación, ver figura Núm. 5.

7.2 EVALUACION DE LA ESPECIFICIDAD.

Como hemos dicho con anterioridad, la especificidad nos reporta el grado en que los resultados solo son influenciados por el principio activo y no por otros compuestos, como pudieran ser los excipientes o los productos de degradación del cefadroxil.

Dadas Estas condiciones, podremos degradar un estándar, un placebo y un placebo cargado, reflejando estas preparaciones durante tres horas, en la fase móvil.

Se prepara una cromatografía en capa fina para comparar: un estándar de P - OH - fenil, que son los posibles productos de degradación del activo, contra las soluciones reflejadas, encontrándose que todas las manchas tenían diferentes R_f , Esto nos dió la pauta para inyectar las muestras degradadas en el CLAR, se observó que los productos de degradación así como:

Los excipientes no interfieren en la cuantificación de cefadroxil.

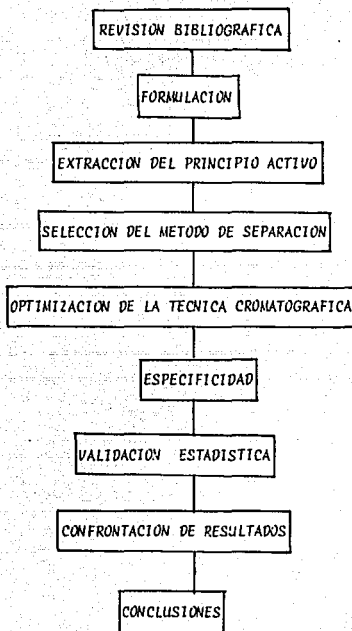


FIGURA 5, Diagrama de flujo del proyecto.

7.3 EVALUACION DE LA EXACTITUD.

Entendamos por exactitud a la concordancia que existe entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia.

Se realizó un análisis de por ciento de recobro de las formulaciones de placebos cargados entre un 80 y un 120 % de la cantidad estipulada en el marbete; se procede a inyectar 5 muestras del 80 %, 5 muestras del 90 %, 5 muestras del 100 %, 5 muestras del 110 % y 5 muestras del 120 %, a Estos datos se les aplica la prueba de t-student para comparación de medias.

7.4 EVALUACION DE LA LINEALIDAD.

Entendemos este parametro como el grado en el que el método se aproxima a una función lineal del tipo $y = a + bx$; se hacen las mismas inyecciones que se usaron para exactitud y se determinan miligramos adicionados así como los miligramos recuperados, Estos datos son sometidos a un análisis de regresión lineal para encontrar las variables $a =$ intercepto y $b =$ pendiente así como $r =$ coeficiente de correlación, a Estos datos se les aplica la prueba de t-student para encontrar así $a = 0$ y $b = 1$.

7.5 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN.

Como hemos mencionado, Este parametro se refiere a una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales con respecto a un valor central, expresado en terminos de repetibilidad y reproducibilidad.

a) La repetibilidad se determinó haciendo 5 inyecciones con 80 % del activo, 5 inyecciones con el 90 %, 5 inyecciones con el 100 %, 5 inyecciones con el 110 %, y 5 inyecciones con el 120 %, a estos datos se les aplica la prueba de χ^2 - cuadrada para evaluar la significación de la variabilidad.

b) La reproducibilidad se evaluó en función de dos diferentes analistas en días diferentes, es decir, se inyectaron 5 muestras del 100 % del activo por cada analista en un día y otras 5 muestras en otro día, a estos resultados se les aplica la prueba de análisis de varianza para dos factores aleatorios, que consiste en evaluar el cociente del estadígrafo F de dos varianzas.

8 RESULTADOS

8.1 ESPECIFICIDAD.

Analizando las gráficas obtenidas para el análisis de la especificidad, figura 6 y 7, se observó que la gráfica de la figura 6 muestra que al degradar un placebo cargado ninguno de los productos de degradación poseen el mismo tiempo de retención que el del estándar de cefadroxil excepto el cefadroxil contenido en placebo.

Analizando la figura 7, podemos darnos cuenta de que al degradar un estándar de cefadroxil, no existen compuestos de degradación que se encimen con el pico característico del cefadroxil.

La figura 8 muestra el tiempo de retención obtenido para un estándar de cefadroxil.

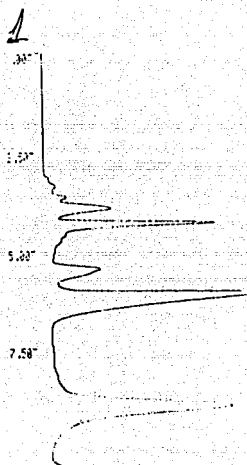


Figura 6 . Degradación de un placebo cargado.

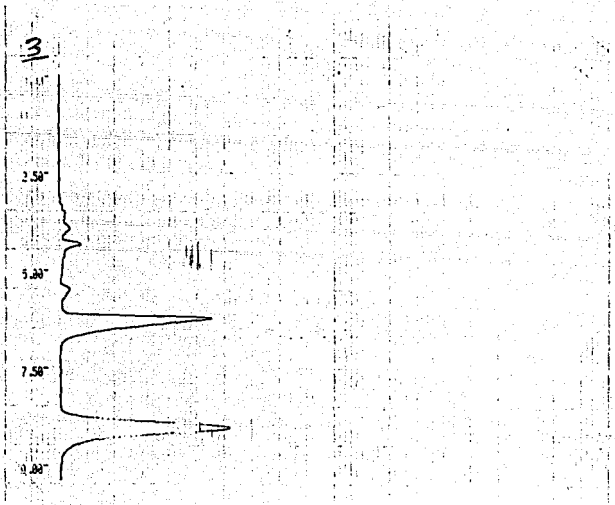


Figura 7. Degradación de un estándar de cefadroxil.

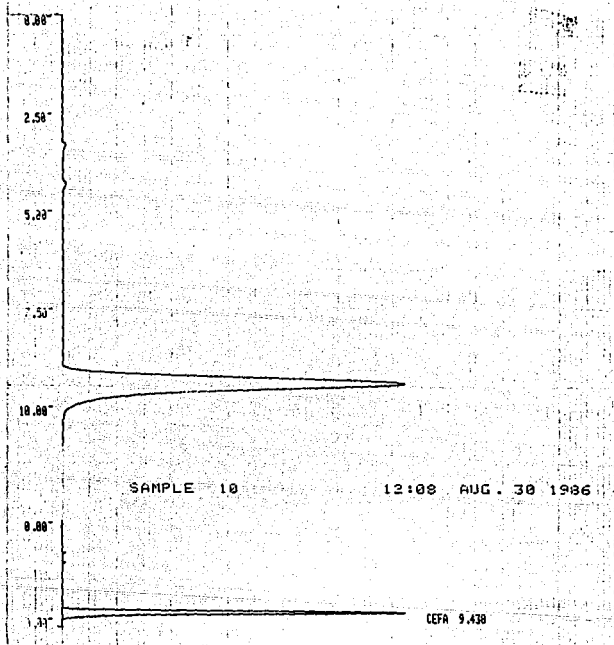
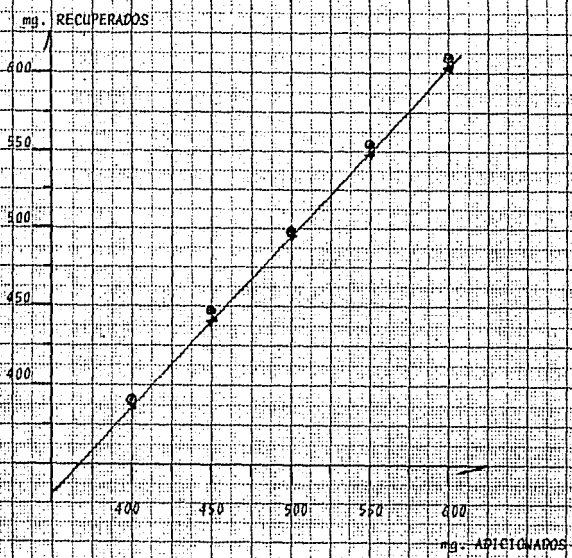


Figura 8. Estándar de cefadroxil.

Mg. ADICIONADOS	Mg. RECUPERADOS	% RECUPERACION
400.0	387.7	96.9
400.0	399.5	99.9
400.0	399.6	99.9
400.0	392.7	98.2
400.0	388.0	97.0
450.0	447.7	99.5
450.0	449.2	99.8
450.0	449.3	99.9
450.0	456.3	101.4
450.0	446.6	99.2
500.0	496.0	99.2
500.0	499.2	99.8
500.0	496.9	99.4
500.0	502.4	100.5
500.0	495.3	99.0
550.0	568.7	103.4
550.0	571.5	103.9
550.0	559.0	101.6
550.0	555.7	101.0
550.0	556.0	101.1
600.0	618.9	103.1
600.0	616.3	102.7
600.0	612.3	102.0
600.0	612.5	102.1
600.0	617.6	102.9

Figura 9. % de recuperación de cefadroxil en suspensión.



() = DATOS EXPERIMENTALES.
(+) = DATOS TEORICOS.

GRAFICA DE INEALIDAD DEL METODO.

8.2 EXACTITUD

$$t_{\text{cal}} = 1.3888$$

$$t (0.975, 24 \text{ g.l. }) = 2.0639$$

$$\text{Area de aceptación} - 2.0639 < 1.3888 < 2.0639$$

$$\text{Intervalo de confianza } 99.8 < 100.5 < 101.2$$

$$\text{Criterio de aceptación } t_{\text{cal}} < t_{\text{tab.}}$$

8.3 LINEALIDAD

8.3.1 ORDENADA AL ORIGEN (a).

$$t_{\text{cal}} = 0.6128.$$

$$t (0.975, 23 \text{ g.l. }) = 2.0687.$$

$$\text{Area de aceptación} - 2.0687 < 0.6128 < 2.0687.$$

$$\text{Intervalo de confianza } -230.2 < -52.6 < 125.0.$$

$$\text{Criterio de aceptación } t_{\text{cal}} < t_{\text{tab.}}$$

8.3.2 PENDIENTE (b).

$$t_{\text{cal}} = 0.5885$$

$$t (0.975, 23 \text{ g.l. }) = 2.0687.$$

$$\text{Area de aceptación} -2.0687 < 0.885 < 2.0687$$

$$\text{Intervalo de confianza } 0.7 < 1.1 < 1.5.$$

$$\text{Criterio de aceptación } t_{\text{cal}} < t_{\text{tab.}}$$

8.3.3 ECUACION DE LA RECTA AJUSTADA.

$$a = -52.6$$

$$b = 1.1$$

$$r = 0.998$$

$$\text{Siendo } Y = -52.6 + 1.1X$$

8.4 PRECISION

8.4.1 REPETIBILIDAD.

$$X^2 \text{ cal} = 19.440$$

$$X^2 (0.975, 24 \text{ g. l.}) = 39.364$$

$$\text{Area de aceptación } 19.440 < 39.364$$

$$\text{Intervalo de confianza } 1.4 < 1.8 < 2.5$$

$$\text{Criterio de aceptación } X^2 \text{ cal} < X^2 \text{ tab.}$$

NOTA: Los calculos necesarios para el tratamiento estadísticos se encuentran en el apéndice.

8.4.2 REPRODUCIBILIDAD.

	DIA 1	DIA 2
	%	%
ANALISTA 1	99.706	98.806
	98.259	99.458
	97.239	99.003
	100.399	100.096
	100.569	98.694
ANALISTA 2	98.633	100.261
	98.586	97.058
	102.469	100.289
	103.963	96.945
	100.871	100.701

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO POR CLAR.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
A	1	2.84	2.84	161.40
D	1	4.40	4.40	161.40
A - D	1	4.19	4.19	4.49
E	16	46.08	2.88	-

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA.

9. CONCLUSIONES

9.1 Se concluye que se pudo desarrollar un método para cuantificar el cefadroxil en suspensión, debido a que se encontraron las condiciones - específicas para extraer el activo de la suspensión así como la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución, esto lo observamos mediante el cromatograma de separación del cefadroxil, figura 8, en el cual se puede ver como el cefadroxil es separado y cuantificado perfectamente.

9.2 Se encuentra que el método cromatográfico resulta ser específico, debido a que los posibles productos de degradación así como los excipientes de la formulación, no interfieren en la separación y cuantificación del cefadroxil; esto se puede observar analizando las gráficas de especificidad del cefadroxil, figura 6 y 7. Dada esta característica, este método puede utilizarse tanto para la cuantificación del activo en muestras de rutina, así como para estabilidades.

9.3 Con respecto a la confiabilidad y / o eficiencia del método - cromatográfico en su totalidad, es decir, desde el punto de vista de la extracción, separación y cuantificación del activo, se analizan los resultados en exactitud, linealidad y precisión (repetibilidad y reproducibilidad), mostrando que es un método exacto con un intervalo de confianza de:

$$99.6 \left\langle 100.5 \left\langle 101.2 \right. \right.$$

Es lineal con un intervalo de confianza para la ordenada al origen de:

$$-230.2 < -52.6 < 125.0$$

Para la pendiente es:

$$0.7 < 1.1 < 1.5$$

Es preciso con un intervalo de confianza para la repetibilidad de:

$$1.4 < 1.8 < 2.5$$

Para la reproducibilidad, debido a que no existe efecto entre dos analistas diferentes, dos días distintos, y no hay interacción entre el analista y el día; esto nos indica que el método puede ser usado en forma rutinaria con la confianza de obtener resultados sin una variabilidad significativa; por otro lado, este método es de fácil manejo sin ofrecer problemas para analizarlo en el laboratorio de Garantía de Calidad.

9.4 Realizando una breve comparación entre el método yodométrico y el cromatográfico, se concluye que puede utilizarse cualquiera de los dos métodos para cuantificar el cefadroxil en suspensión. Sin embargo, el método cromatográfico requiere un menor tiempo de análisis y posee una menor variabilidad en los resultados.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Por lo anterior se implementara el método cromatográfico en lugar del yodométrico, dejando el segundo como alternativa.

9.5 Resumiendo los puntos antes mencionados, determinamos que los objetivos así como la hipótesis se cumplieron en el presente trabajo.

APENDICE

A. EXACTITUD.

Estadígrafo de contraste $t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X} - \mu}{S / \sqrt{n}}$

intervalo de confianza para

$$\bar{X} \pm t_{\frac{\alpha}{2}} \cdot s \cdot \sqrt{\frac{1}{n}}$$

B. LINEALIDAD.

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

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

Error típico de estimación modificado.

$$\hat{s}_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - \frac{a \sum y - b \sum xy}{n}}{n - 2}}$$

Estadígrafo de contraste.

Ordenada al origen (a)

$$t_{\text{cal}} = \frac{a - A}{\hat{s}_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n \bar{x}^2}{n - 1}}}$$

Pendiente (b)

$$t_{\text{cal}} = \frac{(b - B) S_x \sqrt{n-1}}{\widehat{S}_{y/x}}$$

Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{n (\sum XY) - (\sum X) (\sum Y)}{\left[n (\sum X^2) - (\sum X)^2 \right] \cdot \left[n (\sum Y^2) - (\sum Y)^2 \right]}$$

Intervalo de confianza

$$a) a \pm t_1 = \frac{\infty}{2} \cdot \widehat{S}_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{x_i^2}{n (\sum x_i - \bar{x})^2}}$$

$$b) b \pm t_1 = \frac{\infty}{2} \cdot \frac{\widehat{S}_y}{S_x} \cdot \frac{1}{\sqrt{n-1}}$$

C. PRECISION.

a) Repetibilidad.

Intervalo de confianza para

$$\sqrt{\frac{(n-1)S^2}{x_i^2} \cdot \frac{\infty}{2}} < 0 < \sqrt{\frac{(n-1)S^2}{x_i^2} \cdot \frac{\infty}{2}}$$

Estadigrafo de confianza.

$$x_i^2 \text{ cal} = \frac{(n-1) \cdot \dots}{\sigma^2}$$

b) Reproducibilidad.

Modelo lineal estadístico.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + E_{kij}$$

$$i = 1$$

$$j = 1$$

$$k = 1$$

y_{ijk} = Observación del i -ésimo analista del j -ésimo día de la k -ésima repetición.

μ = Media general.

A_i = Analista i -ésimo.

D_j = Día j -ésimo.

AD_{ij} = Dependencia analista - día del i -ésimo nivel y el j -ésimo nivel respectivamente.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS.	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
Analista	$\sum \sum (\bar{y}_{i.} - \bar{y})^2 a$	$a - 1$ (a)	$e = a/a$	e/h
Día	$\sum \sum (\bar{y}_{.j} - \bar{y})^2 b$	$b - 1$ (b)	$f = b/b$	f/h
Analista Día	$\sum \sum (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_{i.} - \bar{y}_{.j} + \bar{y})^2 c$	$(a-1) \cdot (b-1)$ (c)	$g = c/c$	g/h
Error	$\sum \sum (y_{ij} - \bar{y}_{ij})^2 d$	$ab(c-1)$ (d)	$h = d/d$	

TASLA DE AVADEVA.

D. DATOS NECESARIOS PARA CALCULOS

a) Exactitud.

$$\bar{X} = 100.5$$

$$n = 25$$

$$S = 1.8$$

$$\alpha = 0.05$$

b) Linealidad

$$S_x = 72.2$$

$$\sum X = 12500$$

$$S_y = 80.5$$

$$\sum X^2 = 6375000$$

$$\bar{X} = 500$$

$$\sum Y = 12594.9$$

$$a = -52.6$$

$$\sum Y^2 = 6500762.4$$

$$b = 1.1$$

$$\sum XY = 6436550$$

$$\alpha = 0.998$$

$$\sum (X - \bar{X})^2 = 125000$$

$$n = 25$$

$$\hat{\sigma}_{y/x} = 60.1$$

$$\alpha = 0.05$$

c) Precisión (repetibilidad)

$$S = 1.8$$

$$\alpha = 0.05$$

$$n = 25$$

$$\sigma = 2\%$$

Precisión (reproducibilidad).

$$\sum_{i=1}^n \frac{y_i^2}{c_i^2} = 198407.04$$

$$\sum_{i=1}^n \frac{y_i^2}{c_i^2} = 198404.2$$

$$\sum_{i=1}^n \frac{y_i^2}{c_i^2} = 198408.60$$

$$\sum_{i=1}^n \frac{y_i^2}{c_i^2} = 198415.63$$

$$\sum_{i=1}^n \frac{y_i^2}{c_i^2} = 198461.7113.$$

BIBLIOGRAFIA.

1. Paquette, L.A., ; " Principles of modern heterocyclic chemistry ", -
cumings publishing company inc, the OHIO - -
state University, 1968.
2. Litter, M. ; " Farmacología ", El ateneo, Buenos Aires, 1975.
3. Goodman, L.S., ; "The pharmaceutical basis of the rapetics ", The -
Macmillan Co., New York , 1977.
4. The Merck Index, 9th ed. Merck & Co. Rahway, N.J. USA. 1976.
5. Ayres, H.C. ; ; " Análisis químico cuantitativo ", Harla S.A. de -
C.V., México, 1970.
6. Connors, K.A. ; " A textbook of pharmaceutical analysis ", Wiley inter
science publication, New York, 1977.
7. Scott, R.P.T. ; " Contempo-lary liquid chromatography ", Wiley, New-
York, 1976.
8. - Voest, R.W. ; " Introducción a la cromatografía líquida practica ", -
Perkin - Elmer, México 1980.
9. Parris, N.A. ; " Instrumental liquid chromatography a practical ma -
nual on high performarce liquid chromatography gra
phic methods ", Elsevier Scientific, Amsterdam, -
1976.

10. G.D. Searle International Co. " Guidelines for method validation for the product development analytical department", 1979.
11. Remington, R.D.; " Estadística biométrica y sanitaria", Prentice -Hall International, Londres, 1974.
12. Garnica, L.A. ; " Estudio comparativo de dos métodos de cuantificación de vitamina B₁₂ en una formulación inyectable de uso veterinario ", Tesis profesional, UNAM. ENEP ZARAGOZA, México, 1987.
13. Done J.N. ; " Applications of high-speed liquid chromatography ", Wiley, London, 1974.
14. Brown, P.R. ; " High pressure liquid chromatography biochemical and biomedical applications", Academic press, New York, 1973.
15. Breuning, C.P.; " Pharm. Sci., 50, 537 (1961).
16. Van Nelle, P.J.; J. Am Pharm. Assoc, 45, 26 (1956).
17. Rudkin, G.O. ; Anal. Chem, 24, 1155 (1952).
18. Campbell, J.A. ; J. Am. Pharm. Sci, 42, 276 (1953).
19. Deyl, Z.M. ; " Liquid column chromatography a survey of modern techniques and applications ". Elsevier scientific, Amsterdam, 1976.
20. Hamilton, R.J.; " Introduction to high performance liquid chromatography ", Chapman and hall, London, 1978.

21. Spiegel, M.R. ; " Teoría y problemas de estadística", Mc Grand Hill Columbia, 1969.
22. García, M.A. ; " Estudio comparativo de dos métodos analíticos para la determinación analítica de hidrocortisona en una formulación de hidrocortisona al 1% más vioformol al 3% en crema ", Tesis profesional, UNAM, ENEP - ZARAGOZA, México, 1987.
23. Kolthoff, I.N.; " Treatise on analytical chemistry ", Parte 1 Vol. 1, theory and practice, John Wiley and Sons, 1978,
24. Syntex ; Desarrollo farmacéutico, Syntex, S.A. 1985.
25. " Curso teórico - práctico de espectroscopia y validación de técnicas analíticas ", A.F.M.; México, 1981.
26. Cambier, A.S. : J. Am. Pharm. Assoc, 47, 356 (1958).
27. Loy, H.W. : J. Pharm. Soc, 45, 129 (1956)
28. De Merra, L.J.: J. Am. Pharm. Assoc, 45, 129 (1956).
29. Lot, H.M. ; " Estudio del desarrollo y estabilidad para supositorios de fenilbutazona ", Tesis profesional, UNAM, - Fac. de Química , México, 1964.
30. Luna, R.R.E. ; " Desarrollo de un método analítico para la determinación del complejo tripsina-heparina en un medicamento ", UNAM, Fac. de Química, México, 1984.
31. Peñaloza, E.R.I.; " Valoración cromatográfica de óxido de etileno residual en envases de plástico ", UNAM, Fac. de Química México, 1984.

32. Vega, P.A. : "Desarrollo de un método analítico para la valoración de progesterona y benzoato de estradiol en un producto inyectable ", UNAM, Fac., de Química México, - - (1985).