

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA
CUANTIFICACION DE EPINEFRINA EN INYECTABLES

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR:

JORGE ROLANDO LOPEZ MOLINA

PARA OPTAR AL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, junio de 1996

D2.
06
T (178)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR

SECRETARIA: LICDA. ANA FORTUNY DE ARMAS

VOCAL I: MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ

VOCAL II: LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN

VOCAL III: LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE

VOCAL IV: Br. ANA MARIA RODAS CARDONA

VOCAL V: Br. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

TESIS QUE DEDICO

A MI PATRIA GUATEMALA.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.

A TODOS MIS CATEDRATICOS POR SUS ENSEÑANZAS.

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: por haberme permitido alcanzar ésta meta.

A MIS PADRES: Felix Humberto López Ramirez.
Zoila de Jesús Molina de López.
Por su comprensión y apoyo brindado durante toda mi vida.

A MIS HERMANOS: Byron Humberto, Mario René y Zoila Susana.

A MI NOVIA: Ana Beatriz Cordero Monterroso, por su ayuda y comprensión.

A MIS AMIGOS Y

COMPAÑEROS DE ESTUDIO: Nineth Hernández, Sandra de León,
Vicky Conde, Sonia Díaz, Rina Godinez,
Yanira Ruano, Liliana Arriaza,
Patricia Pensamiento, Nelson Pérez,
José Roberto Montes, Erick Martínez,
Miltón Chacón y Teodosio Itzá.

AGRADECIMIENTO

A la Licenciada Aracely de León, por su confianza, apoyo y asesoría en todo momento.

A la Licenciada Lesbia Arriaza, por su colaboración en ésta investigación.

A Laboratorio UNIPHARM, S.A. por su colaboración en la realización de la parte experimental de ésta investigación, especialmente a: Licda. Claudia Albanéz, Licda. Mariela Cabrera, Licda. Belinda de Gardiner, al personal que labora en el departamento de Químicos y secretaría de producción.

INDICE

	Pag.
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
4. JUSTIFICACION.....	11
5. OBJETIVOS.....	12
6. HIPOTESIS.....	13
7. MATERIALES Y METODOS.....	14
7.1. UNIVERSO DE TRABAJO.....	14
7.2. MEDIOS.....	14
7.3. PROCEDIMIENTO.....	15
8. RESULTADOS.....	22
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	34
10. CONCLUSIONES.....	38
11. RECOMENDACIONES.....	39
12. REFERENCIAS.....	40
13. ANEXOS.....	41

1. RESUMEN

La presente investigación se realizó con el fin de validar el método espectrofotométrico modificado para cuantificar epinefrina en productos inyectables, descrito en la farmacopea Británica 1,980. La modificación que se hizo fue el utilizar un patrón para determinar la concentración de epinefrina recuperada y agregar en el tratamiento de muestra 1 ml de solución citrato-sulfato ferroso en lugar de realizar una curva de calibración y agregar 0.1 ml de solución citrato sulfato ferroso respectivamente que es lo que recomienda dicha farmacopea.

Para obtener los resultados, se preparó una solución madre de epinefrina disuelta en buffer de fosfato y una solución concentrada de excipientes de una fórmula piloto para preparar un producto que contiene epinefrina. De las dos soluciones anteriores se midieron alicuotas para diluir y así obtener muestras de producto terminado con concentraciones entre 40 y 130% con respecto a la cantidad de epinefrina a cuantificar en el análisis del producto terminado.

El análisis de las muestras se realizó por triplicado, aplicandose el coeficiente de variación y el porcentaje de epinefrina recuperada para el parámetro de precisión y exactitud respectivamente. Para el parámetro de selectividad se calculó la diferencia entre dos muestras que contienen la misma cantidad de epinefrina con la única diferencia que una contiene excipientes y la otra no. La linealidad se obtuvo por un análisis de regresión lineal.

El método presentó precisión y linealidad, sin embargo, no tuvo selectividad, ya que los excipientes del producto terminado y el buffer de fosfato utilizado para disolver el patrón interfirieron en la lectura de absorbancia, por lo que se obtuvo un porcentaje de epinefrina recuperada fuera del límite de 95% a 105%, aún después de corregir las lecturas de absorbancias de las muestras. Debido a lo anterior, se preparó un patrón con todos los excipientes de la fórmula piloto y una solución madre de epinefrina disuelta en agua acidificada, ya que la presencia del ácido clorhídrico no interfirió en la lectura de absorbancia, sin embargo, se obtuvo variación en el porcentaje de epinefrina recuperada. Al no obtener resultados válidos para el parámetro de exactitud se utilizó en el tratamiento de muestra 0.1 ml de solución citrato sulfato ferroso que es lo indicado por la farmacopea Británica y se obtuvo el porcentaje de epinefrina recuperada con una exactitud dentro del límite de 95% a 105%.

Luego de validar todos los parámetros se aplicó un tratamiento de análisis a dos productos inyectables que contienen epinefrina fabricados en Guatemala, Sin embargo, por no poseer el método selectividad y ser necesario utilizar un patrón con todos los excipientes de la fórmula piloto, las lecturas de absorbancias no son confiables, ya que se desconoce la fórmula cualitativa y cuantitativa del producto.

2. INTRODUCCION

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por estudios de laboratorio que los parámetros requeridos por un método analítico se cumplen.

La validación se aplica siempre que se determine la sensibilidad, precisión y validez de un método analítico, por ejemplo, cuando se modifica un método analítico de una farmacopea, como es el caso de ésta investigación, que tiene como objetivo validar el método analítico espectrofotométrico para cuantificación de epinefrina en inyectables, el cual se describe en la farmacopea británica y la modificación consiste en utilizar un patrón para determinar la concentración de epinefrina recuperada por medio del producto que existe entre la concentración de epinefrina del patrón y la relación entre la absorbancia de la muestra y absorbancia del patrón, en lugar de realizar una curva de calibración, así mismo, el utilizar durante el tratamiento de la muestra 1 ml de solución de citrato sulfato ferroso en lugar de 0.1 ml que es lo que recomienda la farmacopea Británica. El objetivo principal es comprobar que con la modificación mencionada, proporciona resultados analíticos confiables y a la vez se aporta un método alternativo para cuantificación de epinefrina. La literatura actual recomienda que se realice dicha cuantificación por medio de cromatografía líquida de alta precisión, equipo que es de poco acceso para los investigadores interesados en el tema. Para lograr la validación, diversa literatura recomienda para éste tipo de cuantificación de epinefrina, que se evalúen los parámetros de precisión, exactitud, linealidad, rango y selectividad que posea el

método.

Luego de validar el método analítico se aplicó en dos marcas de productos inyectables que se comercializan en Guatemala para determinar que la epinefrina se encuentra entre el rango de 90% y 115% respecto a lo que indica la etiqueta, intervalo aceptado por la USP XXII.

3. ANTECEDENTES

3.1. VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

La eficacia y seguridad de un medicamento puede sólomente ser asegurado por control analítico de su calidad. (1)

El propósito de la validación analítica es asegurar que el procedimiento en consideración es capaz de proporcionar resultados reproducibles y confiables. (1)

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por estudios de laboratorio que los parámetros requeridos por un método analítico se cumplen. Los parámetros listados a continuación pueden no ser aplicables para todos los métodos analíticos, pero permiten conocer en forma general todos los aspectos de la validación que deben considerarse siempre y cuando sean aplicables al método analítico a validar. (1,2)

Estos parámetros son:

- Exactitud.
- Precisión.
- Bias (error sistemático).
- Robustez.
- Linearidad y rango.
- Especificidad, Selectividad e Interferencia.
- Límites de detección.
- Límites de cuantificación.
- Simplicidad.

- Duración del método.
- Costo del análisis.

3.1.1. EXACTITUD:

Es la proximidad de los resultados obtenidos por el procedimiento al valor real. La exactitud es la medida de fidelidad del método analítico. La exactitud puede ser determinada por aplicación del procedimiento a muestras preparadas cuantitativamente del analito a analizar. Los analitos agregados cuantitativamente se encuentran usualmente entre un rango de validación de 10% arriba y abajo del valor real esperado por el método analítico. (1-3)

3.1.2. PRECISION:

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos, cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a varias muestras homogéneas de igual concentración. Precisión es una medida del grado de reproducibilidad de un método analítico bajo circunstancias normales de operación. (1-3)

3.1.3. BIAS (ERROR SISTEMÁTICO):

Es un indicativo de la tendencia de un método a medir otras cosas que no son lo que se desea medir.
(1)

3.1.4. ROBUSTEZ O RUDEZA DEL METODO:

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variedad de condiciones diferentes, por ejemplo: diferentes analistas, laboratorios, instrumentos, diferentes clases de reactivos, variaciones de temperatura, etc. (1-3)

3.1.5. LINEARIDAD Y RANGO:

La linealidad es la habilidad del método para obtener resultados, ya sea en forma directa o indirectamente proporcional a la concentración del analito dentro de un rango determinado.(1-3)

El rango es el intervalo entre el límite inferior y superior en el que el analito ha sido determinado con una precisión, exactitud y linealidad aceptable. (1-3).

3.1.6. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD:

Es la capacidad para medir exacta y específicamente al analito en la presencia de otros componentes en la muestra. (1-3)

La especificidad se refiere a asegurar que la señal de la medición proviene de la sustancia de interés y no de una interferencia del excipiente o de

una impureza. (1,3)

3.1.7. LIMITES DE DETECCION:

Se refiere a la mínima concentración que puede ser detectada en la muestra bajo un estado de condiciones experimentales, pero no necesariamente se puede determinar cuantitativamente. El límite de detección es de importancia debido que a veces es necesario realizar pruebas de pureza o ensayos de dosificación conteniendo bajos niveles de una droga. (1-3)

3.1.8. LIMITES DE CUANTIFICACION:

Se refiere a la concentración mínima del analito que puede ser determinada por el método con una precisión y exactitud aceptables. Se observa que el límite de cuantificación es en la mayoría de los casos de 2 a 3 veces mayor que el límite de detección. (1-3)

3.1.9. SIMPLICIDAD:

Es cuando el análisis puede ser realizado en un número mínimo de pasos y necesita solamente reactivos y equipos sencillos. Debido a que entre más pasos posea un método de análisis hay mayor probabilidad de cometer errores. (1)

3.1.10. DURACION DEL METODO:

Es el tiempo que lleva un análisis completo. Entre más pasos necesita un método para realizarse más tiempo ocupará. Para una industria la duración del método es muy importante para la evaluación de horas-hombre. (1)

3.1.11. COSTO DEL ANALISIS:

La simplicidad del método, el número de pasos involucrados, la disponibilidad y costo de los reactivos, el equipo requerido y la experiencia del analista son los factores que contribuyen al costo del análisis. (1)

3.2. PARAMETROS NECESARIOS A EVALUAR DEPENDIENTES DE LA CATEGORIA DEL METODO ANALITICO.

Estas categorías son las siguientes:

3.2.1. CATEGORIA I:

Comprende los métodos analíticos para cuantificación, principalmente componentes de drogas ó principios activos en productos farmacéuticos terminados. Los parámetros a evaluar son: precisión, exactitud, selectividad, rango, linealidad y robustez. (2)

3.2.2. CATEGORIA II:

Comprende métodos analíticos para determinación de impurezas en drogas ó degradación de compuestos en productos farmacéuticos terminados. Esta categoría incluye ensayos cuantitativos y test de límites; evaluándose para los primeros los parámetros de precisión, exactitud, límite de cuantificación, selectividad, rango, linealidad, robustez; y para el segundo límite de detección, selectividad y robustez y dependiendo de la naturaleza del test se puede determinar el rango y la exactitud. (2)

3.2.3. CATEGORIA III:

Comprende métodos analíticos para determinar otras características del producto final, por ejemplo: disolución, liberación del principio activo, etc. Los parámetros a evaluar son: precisión y robustez y dependiendo de la naturaleza del método analítico se pueden considerar otros parámetros. (1,2)

3.3. METODO PARA CUANTIFICAR EPINEFRINA EN INYECTABLES QUE CONTIENEN LIDOCAINA Y EPINEFRINA SEGUN FARMACOPEA BRITANICA:

A un volúmen equivalente de 0.2 g de lidocaína clorhidrato agregar 20 mg de bisulfito sódico, 0.1 ml de solución citrato sulfato ferroso y 1 ml de buffer de glicina. Mezclar y reposar por 10 minutos, extraer con 10 ml de éter, medir absorbancia de fase acuosa a 540 nm. Calcular el contenido de epinefrina por medio de una curva de calibración. (4)

4. JUSTIFICACION

En la actualidad, el método indicado por la farmacopea USP XXII para realizar la cuantificación de epinefrina sólo o en asociación, se efectúa mediante cromatografía líquida de alta precisión, sin embargo, el costo de un cromatógrafo de éste tipo, así como los accesorios son elevados, al compararlo con el método espectrofotométrico, el cual es más sencillo de manejar y a la vez puede estar al alcance de cualquier analista o empresa farmacéutica interesada en el tema. Por tal razón, la validación del método espectrofotométrico contribuirá a la obtención de información científica sobre la cuantificación de la epinefrina en productos farmacéuticos estériles ó ayudará a las industrias farmacéuticas que fabrican productos a base de esta sustancia, de tal manera, que contará con métodos alternativos, lo que evita pérdida de tiempo, dinero y de ésta manera garantizar un método de análisis.

La epinefrina coadyuva al efecto anestésico en productos que contienen lidocaína, por lo que se requieren métodos válidos útiles para el control de calidad indispensable para aprobación de lotes, estudios de estabilidad y otros.

5. OBJETIVOS

- 5.1. Validar el método analítico espectrofotométrico para cuantificación de epinefrina en cuanto a: precisión, exactitud, selectividad, linealidad y rango.
- 5.2. Cuantificar los niveles de epinefrina en dos marcas de productos inyectables que se comercializan en Guatemala para determinar su contenido respecto a lo que indica la etiqueta y el intervalo aceptado por la USP XXII.
- 5.3. Proporcionar métodos alternativos, sencillos de aplicar y válidos para la cuantificación de epinefrina en productos inyectables, para evaluar su calidad.

6. HIPOTESIS

- 6.1 El método analítico espectrofotométrico para cuantificación de epinefrina en inyectables es preciso, exacto, selectivo y aporta resultados analíticos confiables cuando se analizan productos a base de ésta sustancia.
- 6.2 El contenido de epinefrina en dos marcas inyectables analizadas, está en el rango de 90% y 115% respecto a lo indicado en la etiqueta de los productos analizados.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. UNIVERSO DE TRABAJO

Método analítico espectrofotométrico para cuantificación de epinefrina en inyectables.

7.2. MEDIOS

7.2.1. RECURSOS HUMANOS:

Br. Jorge Rolando López Molina. Autor.

Licda. Aracely de León A. Asesora.

7.2.2. RECURSOS MATERIALES:

7.2.2.1. EQUIPO:

- Espectrofotómetro ultravioleta.

7.2.2.2. REACTIVOS:

- Metabisulfito de sodio.

- Solución de citrato-sulfato ferroso.

- Solución buffer de glicina.

- Buffer de fosfatos.

- Eter.

- Epinefrina base.

7.2.2.3. Cristalería de laboratorio.

7.2.2.4. Muestras de dos productos inyectables que contienen epinefrina.

7.2.3. RECURSOS INSTITUCIONALES:

- 7.2.3.1. Departamento de Análisis Químicos, de UNIPHARM.
- 7.2.3.2. Biblioteca de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 7.2.3.3. Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 7.2.3.4. Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala.
- 7.2.3.5. Biblioteca del INCAP.
- 7.2.3.6. Biblioteca del ICAITI.
- 7.2.3.7. Biblioteca del INTECAP.
- 7.2.3.8. Biblioteca de UNIPHARM.

7.3. PROCEDIMIENTO:

7.3.1. METODO ESPECTROFOTOMETRICO MODIFICADO (4)

La modificación realizada fue utilizar un patrón de epinefrina disuelto en buffer de fosfato para determinar la concentración de epinefrina recuperada por medio del producto que existe entre la concentración de epinefrina del patrón y la relación entre la absorbancia de la muestra y absorbancia del patrón, en lugar de realizar una curva de calibración, que es lo que recomienda la farmacopea Británica. Así mismo, el utilizar durante el tratamiento de muestra 1 ml de solución de citrato sulfato ferroso en lugar de

0.1 ml que lo que indica la farmacopea Británica.

7.3.1.1 PREPARACION DEL PATRON (4)

Pesar exáctamente 50 mg de epinefrina y transferir a un balón aforado de 100 ml. Agregar 50 ml de buffer de fosfatos y colocar en ultrasonido hasta disolución completa. Aforar con el mismo solvente y mezclar. De la solución anterior medir 2 ml y transferir a un balón aforado de 100 ml, aforar con el mismo solvente y mezclar (concentración final 10 ug/ml).

7.3.1.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y PATRON

Medir 10 ml de muestra o patrón y transferirlos a una ampolla de decantación de 125 ml. Tratar la muestra o patrón de la siguiente manera: agregar a la ampolla 20 mg de piro-sulfito de sodio, 1 ml de la solución de citrato-sulfato ferroso y 1 ml de buffer de glicina. Mezclar por 1 minuto y dejar reposar por 10 minutos.

Extraer 3 veces con 10 ml de éter, durando 1 minuto cada extracción y medir la absorbancia de la capa acuosa de la solución a 540 nm. Utilizar agua como blanco.

Calcular el contenido de epinefrina en la muestra por la fórmula siguiente:

$$\text{ug/ml} = \text{Cp} \times \text{Am}/\text{Ap}$$

Donde:

Am = Absorbancia de la muestra.

Ap = Absorbancia del patrón.

Cp = Concentración del patrón en ug/ml.

7.3.2. PARAMETROS A VALIDAR:

- Precisión.
- Exactitud.
- Selectividad.
- Linearidad y Rango.

7.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Cada ensayo necesario para validar un parámetro según la literatura se debe realizar por duplicado, sin embargo, en ésta validación se realizó cada ensayo tres veces.

- PRECISION:

Utilizar 9 muestras homogéneas que contienen 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% y 130% de epinefrina con respecto a la cantidad a determinarse en el producto inyectable al realizarle

el ensayo analítico de cuantificación.

- EXACTITUD:

Se determinó por aplicación del método de cuantificación a muestras que se les ha agregado una cantidad de epinefrina conocida, las cuales corresponden a las mismas asignadas en el parámetro de precisión.

- LINEARIDAD Y RANGO:

La linealidad se determinó mediante la cuantificación de epinefrina a la serie de muestras que contienen las concentraciones de epinefrina establecidas en el parámetro de precisión dentro del rango de 40% y 130% de epinefrina.

El rango es validado por verificación de la precisión, exactitud y linealidad que posea el método de cuantificación, tanto en los extremos como dentro del rango.

- SELECTIVIDAD:

Se determinó por comparación de resultados obtenidos al realizar la cuantificación de

epinefrina de dos grupos de muestras. Los resultados del primer grupo de muestras corresponderán a las que contienen epinefrina con sus respectivos excipientes y que fueron determinados en los parámetros de precisión, exactitud, linealidad y rango. Luego, los resultados del segundo grupo son los obtenidos del análisis de las muestras que contendrán únicamente epinefrina (patrón).

7.3.4. DISEÑO ESTADÍSTICO: (2)

Para el análisis estadístico de resultados, se procedió a calcular la media de los 3 ensayos realizados para cada concentración de epinefrina, y éste dato es el que se utilizó para realizar los cálculos estadísticos, excepto para el caso de la linealidad, ya que es mejor utilizar los tres datos.

- PRECISION:

Se determinó por medio de una desviación estandar relativa (coeficiente de variación).

- EXACTITUD:

Se determinó a partir de los resultados, como porcentaje de epinefrina recuperada.

- LINEARIDAD:

A los resultados se les aplicó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados versus la concentración de epinefrina. Esto se puede ver gráficamente, ploteando los resultados de absorbancia como una función de la concentración de la epinefrina.

- SELECTIVIDAD:

Se determinó por el error sistemático que presentaron los resultados, por medio de la diferencia entre los resultados de los dos grupos de muestras ensayadas.

7.3.5. ANALISIS DE MARCAS PREPARADAS A BASE DE EPINEFRINA
(INYECTABLES):

- Se identificaron los dos productos inyectables comercializados en Guatemala como grupo "A" y grupo "B".

- De cada grupo se analizaron mínimo 2 muestras.
- Las muestras para cada producto inyectable correspondieron a un mismo lote.
- Se prepararon las muestras a leer en el espectrofotómetro.
- Se calculó la cantidad de epinefrina en cada muestra.
- Se determinó si se encuentra el resultado en el rango de 90% y 115% con respecto a lo indicado en la etiqueta, intervalo aceptado por la USP XXII.

8. RESULTADOS

8.1. PRECISION

La tabla 1 muestra las concentraciones teóricas de epinefrina analizadas, las tres lecturas de absorbancia para cada concentración, su desviación estandar y el coeficiente de varianza que no debe ser mayor a 3%.

TABLA 1

[] ug/ml	ABSORBANCIA	DESV ESTN	COEFIC. VARIAN.
4.02	0.0559	0.00025	0.45
	0.0555		
	0.0561		
5.02	0.0670	0.00196	3.03
	0.0622		
	0.0648		
6.03	0.0715	0.00083	1.16
	0.0712		
	0.0731		
7.03	0.0758	0.00014	0.19
	0.0761		
	0.0758		
8.03	0.0840	0.00215	2.53
	0.0883		
	0.0835		
9.04	0.0960	0.00250	2.70
	0.0900		
	0.0919		

[] ug/ml	ABSORBANCIA	DESV ESTN	COEFIC. VARIAN.
10.42	0.1021	0.00127	1.23
	0.1039		
	0.1052		
11.05	0.1123	0.00210	1.83
	0.1174		
	0.1143		
12.05	0.1172	0.00065	0.55
	0.1181		
	0.1188		
13.05	0.1262	0.00285	2.32
	0.1219		
	0.1193		

8.2. EXACTITUD

La tabla 2 muestra la concentración teórica de epinefrina, la media de las tres lecturas de absorbancia para cada concentración que se encuentra en la tabla de resultados del parámetro de precisión, la concentración experimental calculada con la fórmula que se encuentra después del cuadro y su respectiva exactitud que debe estar dentro del límite de 95% a 105% de epinefrina recuperada en las muestras analizadas.

TABLA 2

ug/ml de Epin. Teórico	Media de las absorbancias	ug/ml de Epin. Experimental	Límite 95-105%
4.02	0.0558	7.12	177.11%
5.02	0.0647	8.26	164.54%
6.03	0.0719	9.17	152.22%
7.03	0.0759	9.69	137.83%
8.03	0.0853	10.89	135.61%
9.04	0.0926	11.82	130.77%
10.42	0.1037	13.24	127.05%
11.05	0.1147	14.64	132.52%
12.05	0.1180	15.06	125.02%
13.05	0.1225	15.64	119.84%
10.66 Patrón	0.0855	-----	-----

FORMULA PARA CALCULAR EPINEFRINA RECUPERADA:

$$\begin{aligned} \text{ug/ml epinefrina recuperada} &= [I_p \text{ ug/ml} * A_m / A_p] \\ &= 10.66 * A_m / 0.0835 \end{aligned}$$

donde:

[I_p = concentración de patrón = 10.66 ug/ml (Epinefrina base)

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia de patrón = 0.0835

8.2.1. ANALISIS DE SUSTANCIAS NO PLANIFICADAS:

La tabla 3 muestra la absorbancia que poseen los dos tipos de epinefrina analizadas disueltas en buffer de fosfato, el buffer de fosfatos donde se

disolvió el patrón y los excipientes de la fórmula piloto, que contiene buffer de fosfato.

TABLA 3

SUSTANCIA ANALIZADA	ABSORBANCIA	MEDIA
Buffer de Fosfatos (Solvente de Patrón)	0.0199	0.0209
	0.0211	
	0.0219	
Excipientes	0.0259	0.0273
	0.0265	
	0.0296	
Epinefrina Base (Patrón) disuelto en Buffer de Fosfato	0.0822	0.0835
	0.0834	
	0.0850	
Epinefrina Clorhidrato (Patrón) disuelto en Buffer de Fosfato	0.0697	0.0729
	0.0752	
	0.0739	

8.2.2. CORRECCION DE RESULTADOS DE EPINEFRINA RECUPERADA PARA CALCULAR EXACTITUD, SE CONSIDERA ABSORBANCIA DE EXCIPIENTES Y BUFFER DE FOSFATO:

La tabla 4 muestra el porcentaje de epinefrina recuperada, de los mismos resultados de absorbancia de la tabla 2, con la diferencia de haber aplicado el factor de corrección para el patrón y la muestra (restar absorbancia de buffer de fosfato y excipientes respectivamente), descritos en tabla 3.

Se aplicó la fórmula que se encuentra después de la siguiente tabla.

TABLA 4

ug/ml Epin. Teórico	Media de absorb.	ug/ml Epin. Experiment	Límite 95-105%
4.02	0.0558	4.85	120.65%
5.02	0.0647	6.37	126.89%
6.03	0.0719	7.59	125.87%
7.03	0.0759	8.28	117.78%
8.03	0.0853	9.88	123.04%
9.04	0.0926	11.12	123.01%
10.42	0.1037	13.01	124.86%
11.05	0.1147	14.88	134.66%
12.05	0.1180	15.45	128.22%
13.05	0.1225	16.57	124.21%

FORMULA PARA CALCULAR EPINEFRINA RECUPERADA:

$$\begin{aligned} \text{ug/ml epinefrina recuperada} &= [\text{p}] \text{ ug/ml} * (\text{Am} - \text{Ae}) \\ &\quad / (\text{Ap} - \text{Ab}) \\ &= 10.66 * (\text{Am} - 0.0273) / (0.0835 - 0.0209) \end{aligned}$$

donde:

[p] = concentración de patrón = 10.66 ug/ml

Am = absorbancia de la muestra

Ae = absorbancia de excipientes = 0.0273

Ap = absorbancia de patrón = 0.0835

Ab = absorbancia de buffer de fosfatos = 0.0209

8.2.3. SEGUNDO ANALISIS DE MUESTRAS PARA VALIDAR PARAMETRO DE EXACTITUD, SE CONSIDERAN LOS SOLVENTES:

8.2.3.1. SOLVENTE DE SOLUCION MADRE:

Debido a que la fórmula piloto utilizada para esta investigación incluye buffer de fosfato, el patrón se preparó mediante disolución de epinefrina en buffer de fosfato, sin embargo, ambos buffer de fosfato no se prepararon en la misma relación de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 . Al saber que el buffer interfiere en la lectura de absorbancia del patrón (Tabla 3), entonces la alicuota medida de la solución madre de epinefrina que se preparó con buffer de fosfato y que fue agregada a las muestras analizadas, contiene una cantidad de buffer que afecta en la exactitud del método.

La tabla 5 muestra los resultados de absorbancia del agua destilada y agua destilada acidificada con ácido clorhídrico 2 N.

TABLA 5

SUSTANCIA	ABSORBANCIA	MEDIA
Agua destilada	0.0227	0.0229
	0.0230	
Agua destilada y acidificada	0.0231	0.0230
	0.0229	

8.2.3.2. PORCENTAJE DE EPINEFRINA RECUPERADA:

Se utiliza patrón con excipientes de la fórmula piloto en estudio y solución madre de epinefrina disuelta en agua acidificada, (se consideran los resultados de la tabla 5):

TABLA 6

ug/ml epinef. Téorico	ABSORB.	EPINEF RECUPER LIMITE 95-105%
4.34	0.0521	127.61 %
5.43	0.0582	113.94 %
6.52	0.0695	113.32 %
7.61	0.0773	107.98 %
8.69	0.0831	101.66 %
9.78	0.0920	100.00 %
11.95	0.1139	101.32 %
13.05	0.119	97.25 %
14.13	0.1247	93.82 %

8.2.4. TERCER ANALISIS DE MUESTRAS PARA VALIDAR PARAMETRO DE EXACTITUD, SE CONSIDERA REACTIVO DE ESTABILIZACION Y COLOR:

La tabla 7 muestra los resultados cuando se trató la muestra con 0.1 ml de solución citrato sulfato ferroso recomendado por la farmacopea Británica y no con 1 ml que es una de las modificaciones del método y que fue realizado en los dos análisis de muestras anteriores en el parámetro de exactitud.

TABLA 7

ug/ml epinefrina teórico	ABSORBANCIA	EPINEF.RECUP LIMITE 95-105%
4.22	0.0178	103.87 %
6.33	0.0247	96.10 %
10.54 Patrón	0.0428	100 %
14.76	0.0606	101.12 %

8.3. SELECTIVIDAD

La tabla 8 muestra la diferencia que existe entre dos muestras de las cuales una contiene epinefrina y buffer de fosfatos (patrón) y la otra contiene epinefrina y sus excipientes (producto terminado), se utiliza 1 ml de solución citrato-sulfato ferroso que corresponde a una de las modificaciones del método. Ambas tienen la misma

concentración de epinefrina.

TABLA 8

EPINEFRINA + BUFFER DE FOSFATOS	0.0835 Absorb.
EPINEFRINA + EXCIPIENTES	0.1046 Absorb.
DIFERENCIA DE ABSORBANCIAS	0.0211

La tabla 9 muestra la diferencia entre patrón y muestra preparada con agua acidificada con ácido clorhídrico y patrón y muestra preparada con buffer de fosfato. Ambos patrones y muestras tienen la misma concentración de epinefrina y son tratadas con 0.1 ml de solución citrato sulfato ferroso recomendado por la farmacopea Británica.

TABLA 9

ANALISIS REALIZADO	ABSORBANCIA CON BUFFER DE FOSFATO	ABSORBANCIA CON AGUA ACIDIFICADA CON HCl
PATRON	0.0832	0.0908
MUESTRA	0.0824	0.0393
DIFERENCIA	0.0008	0.0515

8.4. LINEARIDAD

A continuación se presentan los valores de la pendiente (m), el valor constante del intercepto con el eje "y" (A), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente

de determinación (r^2), al utilizar 1 ml de solución de citrato sulfato ferroso que corresponde a una modificación del método.

$$m = 0.00766$$

$$Y = mX + A$$

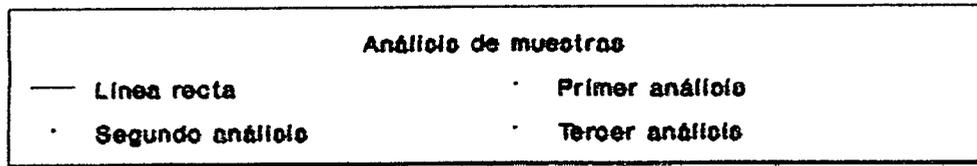
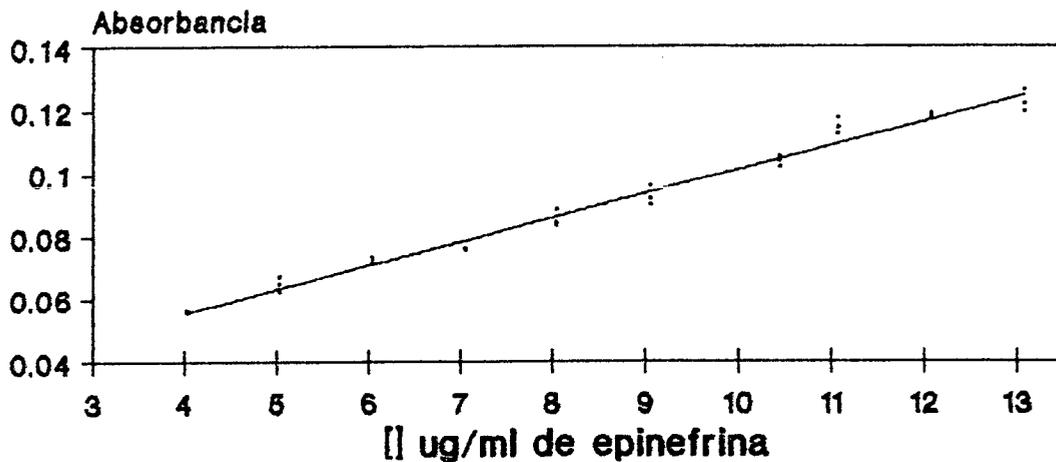
$$A = 0.02485$$

$$r = 0.99223$$

$$Y = 0.00766X + 0.02485$$

$$r^2 = 0.985$$

LINEARIDAD CON 1 ML DE SOLUCION CITRATO SULFATO FERROSO POR TRIPLICADO



A continuación se presentan los valores de la pendiente (m), el valor constante del intercepto con el eje "y" (A), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2), al utilizar 0.1 ml de solución de citrato sulfato ferroso que recomienda la farmacopea Británica.

$$m = 0.00411$$

$$Y = mX + A$$

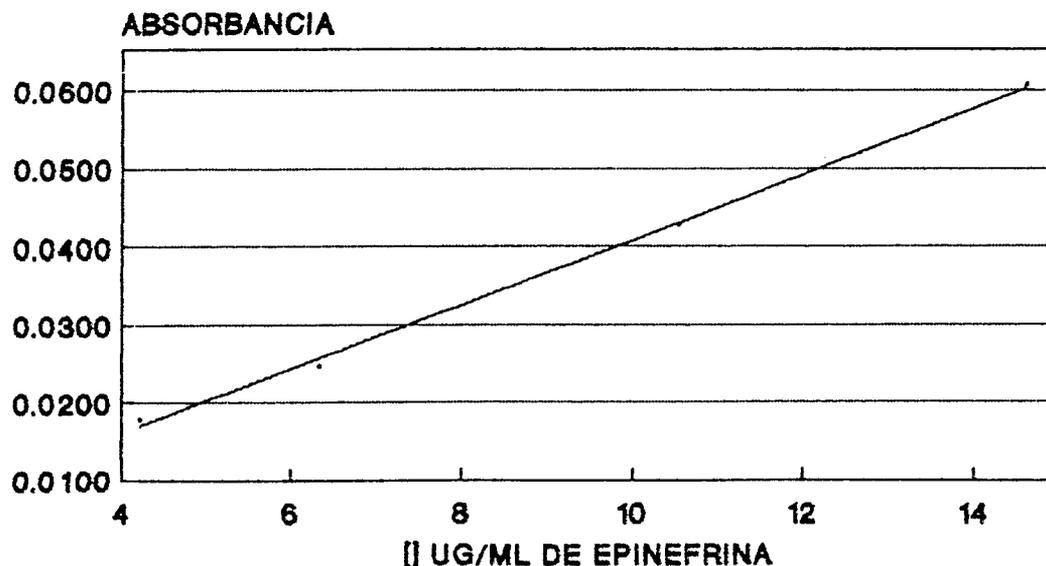
$$A = - 0.0004$$

$$r = 0.9992$$

$$Y = 0.00411X - 0.0004$$

$$r^2 = 0.998$$

LINEARIDAD CON 0.1 ML DE SOLUCION CITRATO SULFATO FERROSO



ANALISIS DE MUESTRAS

— LINEA RECTA

8.5. ANALISIS DE DOS MARCAS PREPARADAS A BASE DE EPINEFRINA EN INYECTABLES:

En la tabla 10 se observa la absorbancia de las dos marcas con su respectivo porcentaje de recuperación que debe de encontrarse entre 90% y 115% según la USP XXII:

TABLA 10

MARCA	ABSORBANCIA	EPINEFRINA RECUPERADA LIMITE 90-115%
A	0.0382	75.21 %
B	0.0500	246.26%

9. DISCUSION DE RESULTADOS

El método espectrofotométrico para cuantificar epinefrina en inyectables es reproducible, ya que los resultados de la tabla 1 presentaron un coeficiente de variación menor a 3%, sin embargo la muestra que contiene 5.02 ug/ml superó el límite en un 0.03% pero por ser un porcentaje pequeño y además ser sólo un resultado de 10 que se obtuvieron, el método es preciso.

El porcentaje de epinefrina recuperada calculada a partir de la media de los tres resultados de absorbancia para cada concentración de epinefrina presentada en el parámetro de precisión (tabla 1), no tuvieron exactitud por sobrepasar el límite de 95 a 105% de epinefrina recuperada, por lo tanto se realizó un análisis de los excipientes de la fórmula piloto y del buffer de fosfato utilizado para preparar la solución madre de epinefrina y el patrón, los cuales presentaron una absorbancia de 0.0273 y 0.0209 respectivamente. Con los datos anteriores se procedió a la corrección de los resultados de absorbancia de las muestras y el patrón, sin embargo, nuevamente la epinefrina recuperada no se encontró en el límite de 95 a 105% de epinefrina recuperada. Debido a que la interferencia del buffer de fosfato y los excipientes no fue controlada y haber preparado las muestras analizadas a partir de alícuotas de una solución madre de epinefrina disuelta en buffer de fosfato en una relación de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 diferente al buffer de fosfato contenido en los excipientes de la fórmula piloto en

estudio, existe una cantidad de buffer en las muestras que interfieren en la exactitud del método, por tal razón, se procedió a analizar dos muestra de agua, una contenía agua destilada y la otra agua destilada acidificada con ácido clorhídrico, las cuales no presentaron diferencia en sus absorbancias (tabla 5). Al saber que el ácido clorhídrico no interfiere en la lectura de absorbancia, se hizo un segundo análisis de muestras preparadas con alícuotas de solución madre de epinefrina disuelta con agua acidificada, eliminandose de ésta forma la interferencia del buffer de fosfato contenido en la alícuota medida de la solución madre y transferida a balones aforados para obtener las muestras de epinefrina a diferente concentración, ya que la alícuota no fue la misma para todas las muestras lo que implica variación en la concentración del buffer en cada muestra analizada. Luego, el patrón se preparó con agua acidificada y se agregó los excipientes de la fórmula piloto en cantidades constantes y equivalentes al contenido de excipientes del producto terminado, de ésta forma se eliminó la interferencia de los excipientes, después se aplicó su concentración y absorbancia en la fórmula respectiva para calcular epinefrina recuperada y se obtuvo resultados fuera de lo requerido (tabla 6). Debido a la variación que se obtuvo en el porcentaje de epinefrina recuperada, se hizo un tercer análisis de muestras, pero se evaluó la interferencia de la solución citrato sulfato ferroso, de tal forma que no se agregó 1 ml que corresponde a una de las modificaciones del método, sino que se agregó 0.1 ml de solución de citrato sulfato ferroso que es lo indicado por la farmacopea

Británica, con lo cual se obtuvo exactitud en los resultados dentro del límite de 90% a 105% (tabla 7).

El método demostró linealidad dentro el rango establecido, tanto para las muestras que se les agregó 1 ml y 0.1 ml de solución de citrato sulfato ferroso, de tal forma, que la absorbancia de epinefrina en solución inyectable es directamente proporcional a su concentración y contenido de excipientes, ya que los resultados poseen un coeficiente de correlación (r) igual a 0.9922 y 0.9992 por lo que su coeficiente de determinación (r^2) es igual a 0.985 y 0.998 lo que implica que el 98.5% y el 99.8% respectivamente, se ajusta Y para X en el modelo lineal.

Por la necesidad de utilizar un patrón que contenga los excipientes del producto a analizar y éste ser preparado con agua acidificada y no con buffer como lo indica la modificación del método, se concluye que el método no es selectivo, lo cual se comprueba con la diferencia de absorbancia entre el patrón preparado con buffer de fosfato y una muestra con excipientes que contiene la misma concentración de epinefrina que el patrón, cuyo valor es 0.0211, todo lo anterior cuando se utiliza en el tratamiento de muestra 1 ml de solución de citrato sulfato ferroso. De igual forma no existe selectividad si se utiliza 0.1 ml de solución de citrato sulfato ferroso y agua acidificada para preparar el patrón y la muestra, ya que existe una diferencia de absorbancia de 0.0515 (tabla 9). Los resultados de patrón y

muestra preparados con buffer de fosfato y utilizar 0.1 ml de solución de citrato sulfato ferroso en el tratamiento de las mismas, da un resultado falso positivo, ya que la diferencia de absorbancia es de 0.0008 (tabla 9) pero, al determinar el porcentaje de recuperación de epinefrina con el patrón que contiene epinefrina y un volumen de excipientes equivalente al que contiene el producto terminado, no se encuentra dentro del límite de 95% a 105%.

Por el análisis de resultados para el parámetro de exactitud y selectividad, la lectura de absorbancia obtenida en las dos marcas preparadas a base de epinefrina en inyectables no son confiables, ya que es necesario conocer la fórmula cualitativa y cuantitativa de cada producto para poder hacer el patrón con un volumen de excipientes equivalentes al que contiene el producto terminado y así aplicar el método. Además, en el mercado existe epinefrina clorhidrato y epinefrina base, las cuales fueron analizadas y se obtuvieron lecturas de absorbancia distintas para cada una (tabla 3), lo que implica otro factor no controlable en los productos preparados a base de epinefrina por desconocer su fórmula cualitativa.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. El método analítico espectrofotométrico modificado para cuantificar epinefrina en inyectables es preciso y lineal (rango de 40 a 130% de epinefrina).
- 10.2. El método analítico espectrofotométrico modificado para cuantificar epinefrina en inyectables no es selectivo.
- 10.3. La exactitud del método espectrofotométrico modificado está dentro del límite de 95 a 105%, cuando se utiliza un patrón que contiene los excipientes del producto a analizar y 0.1 ml de solución de citrato sulfato ferroso en el tratamiento de la muestra.
- 10.4. El patrón y la solución madre de epinefrina debe de prepararse con agua acidificada ($\text{pH} = 2.4 - 2.6$) para lograr exactitud en el método.
- 10.5. Para cuantificar epinefrina en los dos productos inyectables analizados que se comercializan en Guatemala es necesario conocer la fórmula cualitativa y cuantitativa de los mismos.
- 10.6. El método modificado (anexo 4) cumple con los parámetros de precisión, linealidad y exactitud.

11. RECOMENDACION

- 11.1. La solución madre de epinefrina, a partir de la cual se miden alícuotas para preparar las muestras a analizar, debe prepararse hasta el momento que se necesite, debido a que la epinefrina es demasiado sensible a la oxidación por la luz, lo que da lugar a obtener resultados no confiables por la absorbancia que presenta la solución coloreada producto de la oxidación de la epinefrina.
- 11.2. Las absorbancias obtenidas con este método son bajas, por lo que es necesario que el espectrofotómetro proporcione resultados con cuatro cifras decimales, para que éstos sean confiables, por tal razón, deben efectuarse estudios similares para determinar si se modifica la concentración del reactivo que produce la intensidad de coloración de la muestra a leer en el espectrofotómetro.
- 11.3. Debido a que el método no presentó selectividad, se recomienda hacer determinaciones de absorbancia para cada ingrediente de la fórmula piloto en estudio, para conocer específicamente cuáles se incluirán en el patrón y así disminuir el tiempo de preparación y costo del mismo.
- 11.4. Para poder aplicar el método de cuantificación de epinefrina a productos inyectables, debe conocerse la fórmula cualitativa y cuantitativa del producto.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sethi PD. Quiantitative Analysis of Drugs in Pharmaceutical Formulations. 2a. ed. Shaldara, India: CBS Publishers & Distributors, 1993.
2. The Parmacopeia of the United States of America XXII. United States: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1990.
3. Hearn GM. A Guide to Validation en HPLC. England: Elmer Perkin, 1992.
4. British Pharmacopoeia. Volume I y II, London: 1980.
5. Miembros de la Junta de Coordinación y Compiladores. Farmacia Remington. Volumen I y II. 17 ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1987.
6. Mendenhall W. Introducción a la probabilidad y la estadística. México: Grupo editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. 1987.

13. ANEXOS

ANEXO 1:	PAGINA
Información general de reactivos	42
 ANEXO 2:	
Preparación de soluciones	49
 ANEXO 3:	
Formulario para cálculos estadísticos	50
 ANEXO 4:	
Método espectrofotométrico modificado que cumple los parámetros de precisión, exactitud y linealidad.....	51
 ANEXO 5:	
Test de validación del espectrofotómetro Beckman DU 600 utilizado para la validación del método ...	53

ANEXO 1

INFORMACION GENERAL DE REACTIVOS

BITARTRATO DE EPINEFRINA: (5)

- SINONIMOS: Bitartrato de adrenalina.
Tartrato ácido de epinefrina.
Tartrato ácido de adrenalina.
Tartrato de epinefrina.
Tartrato de adrenalina.
Tartrato de hidrógeno (R)-(beta,3,4-trihidroxifenetil)metilamonio.

- FORMULA MOLECULAR: $C_{13}H_{17}NO_7$,

- DESCRIPCION: Polvo cristalino, blanco a grisáceo, sin olor, funde alrededor de los 150 °C con descomposición. Se oscurece lentamente al exponerse al aire y la luz.

- SOLUBILIDAD: Soluble en 3 partes de agua, en 520 partes de etanol al 96%, prácticamente insoluble en cloroformo y éter.

- pH: 3.0 a 4.0 (en solución al 5% peso/volumen).

- ALMACENAMIENTO: Debe guardarse en un frasco hermético, o bien, en un tubo sellado al vacío o con un gas inerte y protegido de la luz.

- PREPARACIONES: Adrenalina inyección.
Adrenalina solución.
Bupivacaina y adrenalina inyección.
Lidocaína y adrenalina inyección.

- ACCION Y USO: Simpaticomimético.

METABISULFITO DE SODIO (5)

- SINONIMOS: Piro sulfito disódico.
Sal disódica del ácido disulfuroso.
- FORMULA MOLECULAR: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
- PESO MOLECULAR: 190.1
- DESCRIPCION: Cristales blancos o polvo cristalino de blanco a amarillento que huele a anhídrido sulfuroso; por exposición al aire y a la humedad se oxida con lentitud a sulfato.
- SOLUBILIDAD: Un gramo en 2 ml de agua; ligeramente soluble en alcohol y libremente soluble en glicerina.
- USOS: Como agente reductor en productos farmacéuticos que se oxidan con facilidad, como clorhidrato de adrenalina y

clorhidrato de fenilefrina para inyección, con el fin de retardar la oxidación.

GLICINA (5)

- SINONIMOS: Glicocola
Acido aminoacético
- FORMULA MOLECULAR: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
- PESO MOLECULAR: 75.07
- DESCRIPCION: Polvo cristalino, blanco, inodoro, con sabor dulce, las soluciones son ácidas frente al tornasol: $\text{pKa} = 9.78$.
- SOLUBILIDAD: 1 gramo en 4 ml de agua, 1254 ml de alcohol, muy poco soluble en éter.

SULFATO FERROSO HEPTAHIDRATADO (5)

- SINONIMOS: Sulfato de hierro (II) heptahidratado.

- FORMULA MOLECULAR: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- PESO FORMULA: 278.0
- DESCRIPCION: Cristales o granulos verde azulado pálido. Es inodoro, con sabor salino estíptico y eflorrece en el aire seco tomando color blanco. En aire húmedo se oxida fácilmente formando sulfato férrico básico de color amarillo parduzco. La solución (1:10) es ácida frente al tornasol; pH alrededor de 3.7.
- SOLUBILIDAD: 1 g en 1.5 ml de agua y 0.5 ml de agua hirviente; insoluble en alcohol.

CITRATO TRISODICO (5)

- SINONIMOS: Citrato de sodio.
- FORMULA MOLECULAR: $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$
- PESO FORMULA: 258.07
- DESCRIPCION: Cristales incoloros o polvo blanco cristalino; con sabor refrescante, salino; estable al aire; la solución acuosa es levemente alcalina frente al tornasol pero no debe enrojecer la fenolfataleína.

- SOLUBILIDAD: 1 g en 1.5 ml de agua a 25°C y en 0.6 ml de agua hirviente; insoluble en alcohol.
- USOS: El citrato de sodio es un agente quelante. Se puede utilizar para evitar el oscurecimiento de soluciones que contienen taninos y a las que se agrega hierro.

BICARBONATO DE SODIO (5)

- SINONIMOS: Carbonato monosódico.
Carbonato ácido de sodio.
- FORMULA MOLECULAR: NaHCO_3
- PESO FORMULA: 84.01
- DESCRIPCION: Polvo blanco, cristalino incoloro y con un sabor salino, levemente alcalino; las soluciones recientemente preparadas con agua fría y sin agitación son alcalinas frente al tornasol; la alcalinidad aumenta por reposo, calentamiento o agitación de la solución; estable al aire seco, pero se descompone lentamente en presencia de humedad.
- SOLUBILIDAD: 1 gramo en 12 ml de agua; en agua caliente pasa a carbonato; insoluble en alcohol.

ETER (5)

- SINONIMOS: Eter dietílico.

Eter etílico.

- FORMULA MOLECULAR: $C_4H_{10}O$

- PESO MOLECULAR: 74.12

- DESCRIPCION: Líquido móvil, incoloro, transparente, de olor característico y sabor dulzón quemante. Es muy volátil e inflamable; su vapor, al mezclarse con aire y entrar en ignición, puede estallar violentamente. Se oxida con lentitud por acción del aire, la humedad y la luz, con formación de peróxidos. Su densidad es de 0.713 a 0.716 a 25°C, correspondiente a un contenido de éter del 96 a 98%; a menor densidad, mayor es el contenido absoluto de éter, la densidad del éter absoluto es 0.7097 a 25°C. Hierve a 35° C.

- SOLUBILIDAD: Se disuelve en unas 12 veces su volumen de agua a 25°C con una ligera contracción de volumen; es miscible con alcohol, benceno, cloroformo, hexano y aceites fijos y volátiles.

ACIDO CLORHIDRICO (5)

- FORMULA MOLECULAR: HCl
- PESO FORMULA: 36.46
- DESCRIPCION: Líquido incoloro fumante que tiene un olor pungente; los vapores y el olor desaparecen al diluirlo con 2 volúmenes de agua; muy ácido al tornasol aunque esté muy diluido; densidad más o menos 1.18.
- SOLUBILIDAD: Miscible con agua y alcohol.
- USOS: oficialmente se le clasifica como recurso farmacéutico que se usa como agente acidificante.

ANEXO 2

PREPARACION DE SOLUCIONES Y ESTANDAR**SOLUCION DE CITRATO-SULFATO FERROSO (4)**

Disolver 0.2 g de piro-sulfito de sodio (Disulfito de sodio) en 40 ml de agua, agregar 0.1 ml de ácido clorhídrico 2 N, 0.15 g de sulfato ferroso (ó 0.55 g de sulfato ferroso heptahidratado) y 2 g de citrato trisódico (citrato de sodio). Esta solución debe ser recientemente preparada.

SOLUCION BUFFER DE GLICINA (4)

(Buffer de ácido aminoacético, ó solución buffer de aminoacetato).

Mezclar 42 g de bicarbonato de sodio y 50 g de bicarbonato de potasio con 180 ml de agua. (Solución A)

Mezclar 37.5 g de glicina y 7.5 ml de hidróxido de amonio 13.5M en 180 ml de agua. Mezclar ésta solución con la solución A y diluir con agua a 500 ml. Agitar hasta que la solución esté completa.

BUFFER DE FOSFATOS pH 5.2 ± 2 (4)

Pesar 0.16 g de disodio hidrogenofosfato dihidratado y 5.8 g de sodio dihidrogenofosfato monohidratado. Trasvasarlos a un balón aforado de 500 ml, disolver con agua y llevarlo a volumen.

ANEXO 3

FORMULARIO PARA CALCULOS ESTADISTICOS (6)

1. MEDIA ARITMETICA

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

2. COEFICIENTE DE VARIACION

$$CV = (\text{desviación estandar} / \text{media}) (100)$$

3. DESVIACION ESTANDAR

$$D.E. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N}}$$

ANEXO 4

**METODO ESPECTROFOTOMETRICO MODIFICADO PARA CUANTIFICAR EPINEFRINA
EN INYECTABLES QUE CUMPLE CON LOS PARAMETROS DE PRECISION,
LINEARIDAD Y EXACTITUD.**

PREPARACION DEL PATRON:

Pesar exactamente 50 mg de epinefrina y transferir a un balón aforado de 100 ml. Agregar 80 ml de agua acidificada con ácido clorhídrico (pH= 2.4 -2.6). Colocar en ultrasonido hasta disolución completa. Aforar con agua acidificada y mezclar (Solución A).

De la solución A medir 5 ml y transferir a balón aforado de 50 ml y aforar con agua ácidificada y mezclar (Solución B).

De la solución B medir 10 ml y transferir a balón aforado de 50 ml, al cual previamente se agregó un volúmen de excipientes que es equivalente al que tiene el producto terminado después que se afore con agua destilada. (Ver fórmula piloto en anexo 5).

TRATAMIENTO DE MUESTRA Y PATRON:

Medir una alicuota de 10 ml de muestra y 10 ml de patrón y transferir cada alicuota a su respectiva ampolla de decantación de 250 ml. Tratar la muestra y patrón de la siguiente manera: agregar a la ampolla 0.02 g de bisulfito de sodio, 0.1 ml de la solución de citrato-sulfato ferroso y 1 ml de buffer de glicina. Mezclar por un 1 minuto y dejar reposar por 10 minutos.

Extraer 3 veces con porciones de 10 ml de éter, durando 1 minuto cada extracción. Medir la absorbancia de la capa acuosa de la solución a 540 nm. Utilizar agua como blanco.

Calcular el contenido de epinefrina en la muestra por la fórmula siguiente:

$$\text{ug/ml} = C_p \times A_m / A_p$$

DONDE:

A_m = Absorbancia de la muestra.

A_p = Absorbancia del patrón.

C_p = Concentración del patrón en ug/ml.

ANEXO 5

TEST DE VALIDACION DEL ESPECTROFOTOMETRO MARCA BECKMAN
DU SERIES 600 UTILIZADO PARA VALIDAR EL METODO

Laboratorio Unipharm S.A.
Departamento de Quimicos

Date: 03/23/96
Time: 10:09

Performance Validation

RunTests StopTests Print

Quit

Warning: Unblock the Beam Instrument number: 4320066
Specification numbers are given in parentheses.

Absorbance Noise test at 500nm
(≤ 0.0002 A)

First reading = 0.000031A

S1 = 0.000015

S2 = 0.000013

S3 = 0.000018

S4 = 0.000013

S5 = 0.000010

S6 = 0.000018

S7 = 0.000011

S8 = 0.000015

S9 = 0.000015

S10 = 0.000009

Average SD = 0.000014

Wavelength Tests

Accuracy (± 0.2 nm)

Nominal	Actual	Difference
656.1	656.10	0.00

Repeatability (± 0.1 nm)

Nominal	Actual	Difference
656.10	656.10	0.00

Resolution Test (≤ 1.8 nm)

Resolution: 1.5448nm

Baseline Flatness Test (≤ 0.001 A)

RMS Flatness: 0.0002

Stability Test (≤ 0.003 A)

Wavelength = 340nm

Period	Delta Abs	Last Abs	Syx
15 minutes	-0.001078	-0.000849	1.1415E-04
15 minutes	-0.000423	-0.001028	1.2110E-04
15 minutes	-0.000478	-0.001697	9.8589E-05
15 minutes	-0.000262	-0.001919	8.3050E-05
60 minutes	-0.002132	-0.001919	1.7132E-04

F. 

Jorge Rolando López Molina
AUTOR

F. 

Licda. Aracely de León Amézquita
ASESORA

F. 

Licda. Beatriz Batres de Jiménez
DIRECTORA DE LA ESCUELA DE
QUIMICA FARMACEUTICA

F. 

Lic. Jorge Pérez Folgar
DECANO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA