

Validación de una metodología analítica para la determinación de dietilenglicol y etilenglicol como impurezas en glicerina y propilenglicol

Úrsula M. Rosabal-Cordoví, Antonio Fonseca-Gola, Juan M. Cordoví-Velázquez, Galina Morales-Torres.*

*Centro de Estudios de Química Aplicada, Universidad de Granma. Universidad de Granma, Carretera Central vía Manzanillo kilómetro 17 1/2 Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba. Laboratorio Farmacéutico de Líquidos Orales Medilip, Carretera Central vía Santiago de Cuba kilómetro 845, Bayamo, Granma, Cuba. umarc55@medilip.biocubafarma.cu

Recibido: 8 de enero de 2014. Aceptado: 31 marzo de 2014.

Palabras Clave: validación, dietilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, glicerina.

Key Words: validation, diethylene glycol, ethylene glycol, propylene glycol, glycerol.

RESUMEN. Se desarrolló y validó una metodología para la cuantificación de las impurezas dietilenglicol (DEG) y el etilenglicol (EG) por Cromatografía de gases con detector de ionización por llama en muestras de glicerina y propilenglicol. Se utilizó Hidrógeno como gas transportador y auxiliar. El programa de temperatura fue de 100 °C por un minuto, rampa a razón de 7,5 °C/min hasta 200 °C. Se utilizó una columna Restek 624. Se seleccionó dimetilsulfóxido como estándar interno, con un flujo en la columna de 4,20 mL/min, la temperatura del inyector y la del detector fueron establecidas a 220 °C y 250 °C, respectivamente. Se determinó la linealidad en un intervalo de concentraciones de 25 – 75 µg/mL para ambas impurezas, logrando coeficientes de determinación superiores a 0,999. Se establecieron límites de detección de 0,0350 µg/mL para el DEG y 0,0572 µg/mL para el EG, mientras los límites de cuantificación fueron de 0,1160 µg/mL para el DEG y 0,1897 µg/mL para el EG. Los recobrados fueron de 99,98 % y 100,00 % respectivamente; con CV de 1,18 % en el DEG y 0,60 % en el EG. Los resultados obtenidos demostraron que la metodología fue lineal, exacta, robusta, sensible y selectiva para ser empleada en la determinación de ambas impurezas en el control de calidad de las materias primas glicerina y propilenglicol.

ABSTRACT. A methodology for the quantification of diethylene glycol (DEG) and the ethylene glycol (EG) impurities by gas Chromatography with flame ionization detector in glycerol and propylene glycol samples was developed and validated. It was selected dimethyl sulphoxide as internal standard. It was used hydrogen as carrier and auxiliary gas. The temperature program was 100 °C holding one minute, then ramp to rate of 7.5 °C/ min up to 200 °C. A Restek 624 column was used, with a flow in column of 4.20 mL/ min. Temperatures of the injector and detector were set at 220 °C and 250 °C, respectively. The linearity was determined at 25 – 75 µg/mL as interval of concentrations for both impurities with correlation coefficients larger than 0.999. Detection Limits were settled down in 0.0350 µg/mL to the diethylene glycol, and 0.0572 µg/mL to ethylene glycol, while the quantitation limits were 0.1160 µg/mL to DEG and 0.1897 µg/mL to the EG. The recoveries were 99.98 % and 100.00 %, respectively; with RSD% 1.18 % to DEG, and 0.60 % to the EG. The obtained results demonstrated that the methodology was linear, accurate, robustness, sensitive and selective to be used in the determination of both impurities in the quality control of the glycerol and propylene glycol as raw materials.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó acerca de numerosos eventos de envenenamiento con productos farmacéuticos contaminados con dietilenglicol (DEG) y el etilenglicol (EG) entre 1995 y 1998 en Haití, Argentina, Bangladesh, India y Nigeria. Como resultado cientos de niños murieron.¹ El Departamento de Alimentación y Drogas de los Estados Unidos (FDA) recomienda que la glicerina utilizada en la elaboración de medicamentos sea analizada, establecida su identidad en la totalidad de los lotes y todos los contenedores debido al DEG y el EG.²

Cumpliendo con esta recomendación el Grupo Empresarial Farmacéutico (QUIMEFA), estableció a su vez la determinación del contenido de dietilenglicol y el etilenglicol como impurezas en los disolventes utilizados para uso farmacéutico en nuestro país.³

En la literatura se describen diferentes métodos para determinar estas impurezas: identificación por infrarrojo (FT-IR),⁴ cromatografía de capa delgada (TLC),⁵ de alta resolución (HPTLC)⁶ y la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC/MS).⁷ También se reporta la combinación del método de identificación infrarrojo (IR), cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía de capa delgada (TLC) desarrollado por Baffi *et al.*, durante la investigación de un envenenamiento y muerte de niños que ingirieron sirope contaminado con estas impurezas en Maracaibo y otros lugares de Venezuela en 1994.⁸

La cromatografía gaseosa es una de la más utilizada para la determinación de estas dos impurezas altamente tóxicas que no deben estar presentes, o como máximo 0,10 % (m/m) de forma individual para cada una de ellas, en estos disolventes;⁹ es una técnica rápida, muy sensible y selectiva. La presente investigación se propone como objetivo desarrollar y validar una metodología analítica para la identificación y cuantificación del DEG y el EG en glicerina y propilenglicol. Para realizar la validación se consultaron los documentos: Regulación 41 del CECMED,¹⁰ NC TS – 368:2004,¹¹ *Text and Methodology ICH Harmonised Tripartity Guideline. 27 October 1994.*¹²

MATERIALES Y METODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio Farmacéutico de Líquidos Orales MEDILIP, Bayamo, Granma, Cuba.

Reactivos

Se utilizaron patrones primarios de propilenglicol y glicerina calidad USP RS, estándar de referencia (Estados Unidos), dietilenglicol y etilenglicol (Panreac, España), dimetilsulfóxido (Merck, Alemania) y agua purificada de una conductividad 0,1 a 0,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Equipos

Para las mediciones se utilizaron dos cromatógrafos de gases, marca SHIMADZU, modelo GC 2010, equipado con detector de ionización por llama, modo de control por presión; programa para la adquisición y procesamiento de los datos cromatográficos GC Solution versión 2.30.00-2004, un generador de hidrógeno marca Parker modelo FID – 1000 NA. Se empleó una columna Rtx- 624 de 30 m, Φ 0,53 mm, 3,0 μm y una columna Agilent DB- 624 de igual composición y características a la anterior.

Las condiciones cromatográficas fueron: Temperatura del inyector: 220 °C, temperatura del detector: 250 °C, flujo de la columna: 4,20 mL/min, velocidad lineal: 38,0 cm/min, como gas transportador y auxiliar el Hidrógeno, la relación de Split: 10:1, flujo total de 49,6 mL/min. El volumen de inyección: 1 μL . La temperatura del horno se programó a 100 °C durante un minuto, rampa a razón de 7,5 °C/min hasta 200 °C.

Los análisis estadísticos fueron realizados por los programas Design – Expert versión 6.0.1. Stat Ease, Inc. 2000, Stat Graphic Centurion Versión 14. 0 y Excel del Paquete Microsoft Office 2010.

Procedimiento

Se prepararon disoluciones estándar de las impurezas correspondientes al 50 % (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 80 % (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100 % (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 120 % (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 150 % (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se empleó dimetilsulfóxido (DMSO), como estándar interno, a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Selectividad del método

Se procedió a establecer los tiempos de retención t_r de las impurezas DEG y el EG frente al DMSO (estándar interno), PG y GL (como materias primas) a concentración 4,0 mg/mL. Se compararon los cromatogramas de todos los compuestos de interés, para demostrar que no existía interferencia entre la señal de las impurezas el estándar interno y las materias primas.

Robustez del método

Este ensayo evalúa la respuesta obtenida cuando se aplican ligeras variaciones al sistema y permite identificar cuáles son las variables críticas para el procedimiento de trabajo.

Se evaluó analizando la posible influencia de cinco factores: temperatura del horno (99, 100, 101 °C), temperatura del inyector (219, 220, 221 °C), temperatura del detector (249, 250, 251 °C), fabricantes de columnas (Restek y Agilent) y medición del volumen (pipeta automática y pipeta volumétrica). Se procesaron los resultados, aplicando el programa estadístico Desing Expert 6.0.1 (DX6), con un estudio tipo factorial en su variante optimizada. Se realizaron 34 corridas y se procesaron estadísticamente como factor de respuesta la concentración de la muestra al 100 %. Se determinaron ecuaciones que mejor explicaron el ajuste de las variaciones de los factores y se determinó la capacidad del proceso a través del estadígrafo inferencial deseabilidad (*desirability*), aplicando como criterio de aceptación igual a 1,0.

Linealidad del método

Se determinó a partir del estudio de cinco niveles de concentración entre 50 a 150 % del valor de las impurezas permitidos. Se determinaron las respectivas ecuaciones de la recta por ajuste de mínimos cuadrados, coeficientes de correlación (R) y determinación (R²), coeficiente de variación del factor de respuesta (CV_{fr}%), las pruebas de significación de la pendiente y ensayos de proporcionalidad.

Exactitud del método

Se ensayaron 3 niveles de concentración (80, 100 y 120 %). Se determinaron las recuperaciones medias y global (Recup). Se determinaron los estadígrafos descriptivos: media (X_m), desviación estándar (S), varianza (S²) y coeficiente de variación (CV). La homocedasticidad se determinó mediante la prueba de Cochran (C (p = 3; n = 3; p-valor = 0,05)) y la media de recuperación y el 100 % se compararon a través de la dócima de Student (t (g-1 = 8; p-valor = 0,05)).

Precisión del método

Para la repetibilidad se utilizaron las concentraciones del ensayo de exactitud. Se determinaron los CV para cada nivel de concentración.

Para la precisión intermedia se analizaron las influencias de 2 analistas, tres días diferentes, dos equipos, tres niveles de concentración (80, 100, 120 %). Cada nivel se analizó por triplicado. Se calcularon las X_m, S y CV. Se verificaron la homogeneidad de las varianzas para cada nivel de concentración entre cada analista y entre los días. De igual manera se compararon las medias a través de una prueba de Student variante bilateral.

Límite de detección y de cuantificación del método

Se realizó a partir de la extrapolación de la curva de linealidad. Se determinó la respuesta del blanco (Y_{bl}), la desviación estándar del blanco (S_{bl}) y se calculó a partir de la ecuación:

$$C = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

Donde:

K: 3 para límite de detección (LDD) y 10 para el de cuantificación (LDC).

Para cuantificar las impurezas en las materias primas PG y GL, se aplicó la fórmula:

$$C\% = (R_M / R_R) \cdot C_R$$

Donde:

R_M: Área del contaminante en la muestra / Área del estándar interno DMS, R_R = Área del contaminante en la solución estándar / Área del estándar interno DMS y C_R: concentración del contaminante en el estándar de referencia (mg/mL) y D: factor de dilución de la muestra: D=10000/P_M, donde P_M: peso de la muestra en mg.

Cada contaminante por separado no debe exceder el 0,1 %, como criterio de calidad para la aprobación del uso de ambas materias primas en la elaboración de medicamentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para demostrar la calidad de las materias primas glicerina y propilenglicol utilizadas en la elaboración de medicamentos en el Laboratorio Farmacéutico Medilip, se procedió a elaborar y evaluar una metodología analítica para la identificación y determinación de las posibles impurezas EG y DEG.

Selectividad del método

Los resultados (Tabla 1) mostraron en los parámetros cromatográficos estudiados: tiempo de retención en minutos (T) y tiempo de retención relativo respecto al DMS en minutos (T vs T DMS), que el método es selectivo, criterio que se corrobora con la (Figura 1) al no encontrarse interferencia entre el estándar interno con las impurezas y con el resto de los compuestos de interés.

Tabla 1. Estudio de los parámetros cromatográficos de la selectividad.

Compuesto	T	T vs T DMS
EG	3,767	0,582
PG	4,240	0,655
DMS	6,474	1,000
DEG	8,515	1,315
GL	9,494	1,466

T tiempo de retención. T vs T DMS tiempo de retención relativo respecto al estándar DMS.

Se comprobó que el método fue selectivo (Figura 1), al no encontrarse interferencia entre la señal de ninguno de los compuestos de interés.

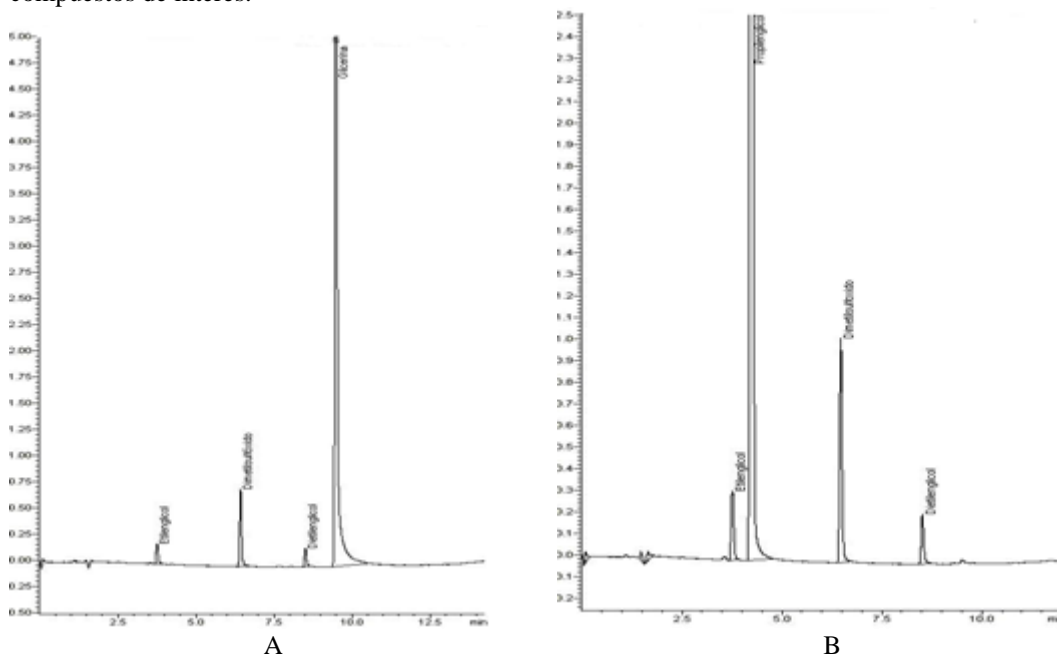


Fig 1. Cromatogramas del estudio de selectividad del método. A) cromatograma de la GL más impurezas y DMS. B) cromatograma del PG más impurezas y DMS.

Robustez del método

En la robustez se demostró la entrada aleatoria de los datos a partir del gráfico de residuales estudiantizados contra las corridas (Figura 2), no existiendo ningún modelo matemático que explique el comportamiento.

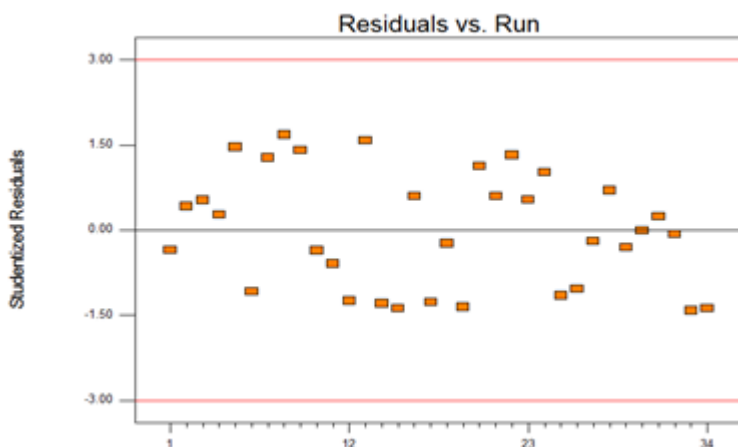


Fig 2. Residuales estudiantizados contra las corridas en el estudio de la robustez.

El modelo aplicado que mejor explicó el comportamiento de las variabilidades de los factores fue el lineal. El intervalo de tolerancia fue de 98,0 % a 102,0 %, con importancia 5. El resultado arribó a 108 soluciones posibles sin afectación de los resultados. En cada una de las soluciones mostró capacidad adecuada al obtenerse valores de deseabilidad igual a 1,00 por lo que la metodología propuesta resultó ser robusta.

Linealidad del método

A partir de los resultados estadísticos mostrados en la (Tabla 2) para la prueba de linealidad del método se demuestra que los coeficientes de correlación presentaron valores superiores al 99,0% por la prueba de significación de la pendiente, obteniendo valores de la prueba de la dócima de Student superiores al valor crítico, evidenciando fuertes relaciones seriadas entre las variables dependientes (concentración) y las independientes (área del pico) para cada nivel.

Tabla 2. Resultados del ensayo de linealidad.

Parámetros	Etilenglicol	Dietilenglicol	Criterios de Aceptación
Y	Y=0,00689X-0,0008	Y=0,0438 X-0,0003	y=ax+b
R (%)	99,98	99,99	$R \geq 99,00$
R ² (%)	99,97	99,98	$R^2 \geq 98,00$
CVfr (%)	0,68	0,42	$CVfr\% \leq 5,00$
Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente			
Desviación estándar (Sb)	0,0000332	0,000016	
t _{exp} =	207,371	279,989	t _{exp} >t _{crít} , b≠0
Student, (p-0.05, n-2)	2,160		
Sb _{rel} %	0,48 %	0,357 %	Sb _{rel} % < 2,00 %
Intervalos de confianza: (ICb) b± tSb	IC _{inferior} :0,0068 IC _{superior} :0,0070	IC _{inferior} : 0,0043 IC _{superior} : 0,0044	El intervalo no incluye el cero
Prueba de Proporcionalidad o verificación de la variable independiente			
Valor del intercepto (a)	-0,001	-0,0003	-
t _{exp} =	0,447	0,0008	SI, t _{exp} <t _{crít} , a=0
Dócima de Student, (tp-0.05, n-2)	2,160		
Intervalos de confianza	IC _{inferior} : -0,005 IC _{superior} : 0,003	IC _{inferior} : -0,002 IC _{superior} : 0,001	(ICa) a± tSa : El intervalo incluye el cero

Y ecuación de la recta. R Coeficiente de correlación. R² Coeficiente de Determinación. CVfr: Coeficiente de variación del factor de respuesta.

La prueba de proporcionalidad muestra poca variabilidad de los residuales para cada nivel al no existir diferencias estadísticas significativas, a partir de la prueba inferencial de Student y el intervalo de confianza (incluye el cero). Los coeficientes de determinación deducen que ambos modelos justifican más del 99,0 % de la variabilidad los resultados. El grado de ajuste o sensibilidad se demostró con los valores de los coeficientes de los factores de respuestas, que para los dos analitos (EG y DEG) se comportaron por debajo del 5,0% exigido.

Exactitud del método

En el rango seleccionado para el estudio de exactitud, los valores de porcentajes de recobrado estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98-102 %) y el coeficiente de variación, fue menor que el 2 % como muestran los resultados (Tabla 3).

En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud, al aplicar la prueba de Cochran, se obtuvo que C calculada fue menor que la C tabulada para una probabilidad de 0,05, p=3 y n=3; por lo tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas fueron equivalentes, indicando que la concentración no influyó en la variabilidad de los resultados.

Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100 % de recuperación, se obtuvo una t calculada menor que la t tabulada, confirmando la elevada exactitud del método ya que el recobrado medio no difiere significativamente del 100 %. Teniendo en cuenta estos resultados se puede afirmar que los errores sistemáticos tuvieron muy bajo impacto en la calidad de los resultados analíticos.

Tabla 3. Resultados estadísticos de la Exactitud.

Valor accept. ($\mu\text{g/mL}$)	Etilenglicol				Dietilenglicol				
	Recup. %	Xm (%)	S (%)	CV (%)	Valor accept. ($\mu\text{g/mL}$)	Recup. %	Xm (%)	S (%)	CV (%)
40,328	99,228	100,000	0,802	0,802	40,320	99,859	99,980	0,440	0,440
	99,944					99,613			
	100,828					100,468			
50,410	99,469	100,000	0,638	0,638	50,410	100,313	99,980	0,515	0,515
	99,824					99,387			
	100,707					100,240			
60,492	99,469	100,000	0,638	0,638	60,492	100,313	99,980	0,515	0,515
	99,824					99,387			
	100,707					100,240			
Xm	100,000		$t_{\text{exp}}=$	0,000	Xm	99,980		$t_{\text{exp}}=$	0,140
S ²	0,364		$t_{(0,05;n-1)}=$	2,306	S ²	0,181		$t_{(0,05;n-1)}=$	2,306
S	0,603		$C_{\text{exp}}=$	0,386	S	0,425		$C_{\text{exp}}=$	0,350
CV%	0,603		$C_{(0,05;3;3)}=$	0,871	CV%	0,425		$C_{(0,05;3;3)}=$	0,871
IC	99,536	a		100,464	IC	99,653	a		100,307

Precisión del método

Se muestran los resultados estadísticos de las pruebas de repetibilidad (Tabla 4) para las impurezas DEG y el EG. Por los análisis inferenciales de Grubbs (G) y Cochran (C) se aprecia que los valores obtenidos se pueden considerar no erráticos o burdos, por lo que no fue necesaria la obtención de más datos.

Tabla 4. Resultados del estudio de repetibilidad del método para la determinación de DEG y el EG en Glicerina y Propilenglicol.

Réplicas	Etilenglicol			Dietilenglicol		
	80% ($\mu\text{g/mL}$)	100% ($\mu\text{g/mL}$)	120% ($\mu\text{g/mL}$)	80% ($\mu\text{g/mL}$)	100% ($\mu\text{g/mL}$)	120% ($\mu\text{g/mL}$)
M1	40,017	50,142	60,171	40,271	50,342	60,681
M2	40,305	50,321	60,385	40,172	50,553	60,121
M3	40,662	50,766	60,920	40,517	50,305	60,637
Xm ($\mu\text{g/mL}$)	40,328	50,410	60,492	40,320	50,400	60,480
S ($\mu\text{g/mL}$)	0,323	0,321	0,386	0,177	0,133	0,311
CV (%)	0,802	0,638	0,638	0,440	0,265	0,515

En los estudios intraensayos (repetibilidad) se alcanzó un CV adecuado en todos los niveles de concentración, lo que demuestra la buena repetibilidad del método ya que cumplió con el límite establecido.

Los valores que se obtienen de las pruebas de Fischer para el estudio de la precisión intermedia (Tabla 5) demostraron que no existieron diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas, ni entre las precisiones alcanzadas en los diferentes días, para una probabilidad de 0,05 %, ya que el valor de F calculada fue menor que la F tabulada (3,44 para los analistas y 5,05 para los días). Al realizar la prueba de t- Student el valor calculado resultó ser menor que el tabulado para una probabilidad de 0,05, lo cual demuestra que no existieron diferencias significativas

entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 5 %. El conjunto de estos resultados sugirió que los errores aleatorios tuvieron muy bajo impacto en la calidad de los resultados obtenidos para ambas impurezas.

Tabla 5. Resultados del estudio de precisión intermedia.

Etilenglicol, CV (%)			Dietilenglicol, CV(%)			
Conc. (%)	Analista 1	Analista 2	Global	Analista 1	Analista 2	Global
80	0,46	0,49	0,46	0,28	0,38	0,32
100	0,41	0,49	0,44	0,43	0,42	0,41
120	0,41	0,49	0,44	0,39	0,39	0,37

Límite de detección y de cuantificación del método

Los resultados mostraron (Tabla 6) la capacidad del método para establecer los límites de detección y cuantificación para DEG y el EG; por lo que se puede concluir que el método fue suficientemente sensible para cuantificar una concentración de 0,1160 µg/ mL y detectar hasta 0,0350 µg/mL para el DEG y cuantificar 0,1897 µg/ mL y detectar hasta 0,0572 µg/ mL para el EG; resultados superiores en cuanto a capacidad de detección y cuantificación a los obtenidos por Baffi⁸ que fueron de 1,0 µg/mL y 0,15 µg/mL en cuanto a cuantificación y detección respectivamente para DEG en propilenglicol y similares a los obtenidos por Zhu⁷ de 0,1 µg/mL para el etilenglicol por GC/MS en propilenglicol.

Tabla 6. Límites de detección y cuantificación para DEG y el EG.

Parámetros	Etilenglicol	Dietilenglicol
Ecuación de la recta (bx+a)	0,68676 X +0,00043	0,43698X +0,00021
Respuesta a tiempo cero	0,00043	0,00021
S a concentración cero	0,02252	0,00876
No. de determinaciones (n)	15,00000	15,00000
Límite de detección	0,0572 µg/mL	0,0350 µg/mL
Límite de cuantificación	0,1897 µg/mL	0,1160 µg/mL

CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología por cromatografía gaseosa para la detección y cuantificación de las impurezas (DEG y EG) en propilenglicol y glicerina, que al ser validada demostró ser selectiva, robusta, lineal, exacta y precisa en el intervalo de concentraciones estudiado (25-75 µg/mL), adecuada para su uso en la liberación de las materias primas propilenglicol y glicerina para el criterio de calidad farmacéutica. El uso del hidrógeno como gas transportador y auxiliar disminuye el costo de realización del ensayo; tanto por tiempo de corridas, como por el costo del mismo, lo que constituye novedades del método respecto a otros publicados.

Referencias bibliográficas

1. World Health Organization (WHO), Report of the Diethylene Glycol Contamination Prevention Workshop, 1997, p. xi.
2. Food and Drug Administration (FDA). Office of Training and Communications Divisions of Drug Information. Rockville. MD. May, 2007.
3. Circular No. 1-2007. Grupo Empresarial Farmacéutico QUIMEFA. Requerimiento de los ensayos del dietilenglicol y el etilenglicol tanque a tanque a las materias primas glicerina, propilenglicol y sorbitol.
4. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., *United States Pharmacopeia 29—National Formulary 24*, 2006. Rockville. Volume III, p-3750.
5. Kenyon S.A., Shi X, Wang Y and Wai H Ng. Simple, At-Site Detection of DEG/EG contamination of Glycerin and Glycerin-Based raw materials by TLC. *Journal AOAC International*. 1998; 81 (1): (44 - 50).
6. Ghanem H, Alkhatat M.A. and Almardini M.A. Detection of Diethylene Glycol in Glycerin and Propylene Glycol by using high performance thin layer chromatography HPTLC. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2012; 1 (1): 029-034.
7. Zhu J.P., Feng Y.L. and Aikawa B. A positive chemical ionization GC/MS method for the determination of airborne ethylene glycol and propylene glycols in non-occupational environments. *J-Environ-Monit*. 2004; 6(11): 881-887.

8. Baffi P, Elneser S, Baffi M and de-Melin M. Quantitative Determination of Diethylene Glycol Contamination in Pharmaceutical Products. *Journal of AOAC International*. 2000; 83 (4): 793-801.
9. *British Pharmacopoeia* 2007. General Notice: Glycerol. Version 11.0. Vol. I p. 759.
10. Regulación No. 41 – 2007 “Validación de Métodos Analíticos. Centro para el Control Estatal de los medicamentos (CECMED). No 00-53. ISSN 1684- 1832.
11. NC - TS-368: 2004. Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos.
12. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. October 1994.