

24/10



Universidad Nacional Autónoma de México

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"**

Desarrollo y validación del método de cuantificación
de Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona
Magnésica por Cromatografía de Líquidos
contenidos en una solución inyectable

T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo
P R E S E N T A
JOSE ADRIAN FLORES HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1987.



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

	página
INTRODUCCION	1
1. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Cromatografía de líquidos moderna	3
1.3. Clasificación de la cromatografía de líquidos de alta resolución	5
1.4. Instrumentación	7
1.4.1. Columnas	6
1.4.2. Bombas	11
1.4.3. Programadores de fase móvil	13
1.4.4. Inyectores	14
1.4.5. Detectores	15
1.4.6. Registradores y procesadores de datos	19
1.5. Desarrollo de un método de análisis por Cromatografía de líquidos	20
1.6. Métodos de cuantificación	23
2. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	25
2.1. Antecedentes	25
2.2. Definición	26
2.3. Parámetros de la validación	26
2.4. Realización de una validación	28
2.5. Criterios sobre validación de métodos analíticos	29
2.6. Documentación y revalidación	33

3. DESARROLLO DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE BROMHEXINA Y DAPIRONA MAGNESICA	35
3.1. Planteamiento del problema	35
3.2. Material y métodos	41
3.3. Desarrollo experimental	42
3.3.1 Consideraciones previas	42
3.3.2. Desarrollo del método de análisis	42
3.3.3. Validación del método analítico	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1. Desarrollo del método analítico	50
4.2. Validación del método analítico	60
5. CONCLUSIONES	91
6. RECOMENDACIONES	92
7. BIBLIOGRAFIA	93

INTRODUCCION

Las enfermedades del sistema respiratorio ocupan un alto ---- índice de morbilidad en México, ocasionando problemas y molestias en fosas nasales, tráquea, laringe y bronquios. Estas se caracterizan, principalmen te, por un fluido nasal, producción de mucosa viscosa y, como consecuencia, la irritación de la zona.¹⁰ De aquí, que se cuente con medicamentos que ayu- den a mitigar, corregir o, simplemente, evitar complicaciones de dichas - molestias. Clasificándose por su acción farmacológica en: broncodilata---- dores, antipiréticos, antihistamínicos, antiinflamatorios, antitusivos, etc.

Dos fármacos muy útiles en el tratamiento de las principales - molestias del sistema respiratorio, son: Clorhidrato de Bromhexina y Dipi- rona Magnésica. El primero, con acción expectorante del tipo mucolítico; - y el otro, con acción analgésica-antipirética del tipo no narcótico. Ambos con un amplio espectro terapéutico y con reacciones secundarias inferiores a su actividad farmacológica. Esto justifica, en un momento dado, pensar - en un medicamento constituido por los principios activos mencionados en sus respectivas dosis terapéuticas.

Por otra parte, desde que se inicia el desarrollo de un medicamento y se planea su producción a nivel industrial se prevén controles -- dentro y fuera de los procesos que lo conforman, garantizándose de este -- modo la calidad del producto. Uno de estos controles, cuya importancia es relevante en la calidad, lo constituye la determinación analítica del --- contenido de fármaco dentro del medicamento en cuestión. Dicha importancia radica en la responsabilidad del farmacéutico ante el paciente, de ofrecer la dosis adecuada acorde con el efecto farmacológico deseado; razón de ser de todo medicamento.

El desarrollo de este proceso analítico, en que se consideran los recursos, el alcance y la utilidad del mismo, el químico farmacéutico orienta sus esfuerzos, primero, hacia la elección de un método de análisis que sea sencillo, económico y rápido. Después, se encarga de demostrar su validez estableciendo su exactitud, precisión y especificidad.

El siguiente trabajo plantea el desarrollo y validación del -- procedimiento de análisis de una solución inyectable que contiene Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica por Cromatografía de líquidos de alta resolución, a dosis terapéuticas de 1.6 y 200 mg/ml, respectivamente.

Este desarrollo se basa en las características fisicoquímicas de los fármacos ya mencionados, mismas que establecen las bases fundamentales para lograr una cuantificación precisa, exacta y específica.

Para lograr este objetivo el trabajo se divide en en tres --- partes. La primera señala los aspectos ha considerar en el desarrollo de - la técnica cromatográfica, esto es, considerar parámetros, instrumentos y criterios en su evaluación. La segunda parte se encarga de desglosar aquellos conceptos utilizados en la validación de métodos; por lo que se ----- describe cada uno de los parámetros y criterios a seguir.

Como parte final, se describen los objetivos, las experiencias y los resultados logrados dentro del diseño del procedimiento de cuantificación y validación de ambos fármacos estudiados en este trabajo.

1. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

17

1.1. Antecedentes.

El desarrollo de métodos analíticos en base a técnicas cromatográficas tiene sus orígenes a partir de 1906, cuando es realizada la primera separación de compuestos coloridos de una mezcla de pigmentos vegetales. A esta técnica se le dió el nombre de Cromatografía (khromatos= color; graphos=escritura).

A lo largo de su evolución, la cromatografía ha hecho diferentes combinaciones de materiales y sustancias químicas, con el afán de realizar más y mejores separaciones dentro de las distintas áreas de investigación. Dichas combinaciones han permitido la clasificación de la cromatografía en tres grandes grupos, que son: Cromatografía de capa delgada, Cromatografía de líquidos en columna y Cromatografía de gases (fig. 1.1.).

La primera, por regla general, comprende un fenómeno de absorción entre los componentes de la mezcla de interés disueltos en una fase móvil (el disolvente) y una fase fija o estacionaria (sílica gel). Las dos últimas están regidas principalmente por un fenómeno de distribución de la mezcla entre una fase estacionaria que se encuentra en un soporte empacado en una columna y la fase móvil, que en su caso, es un líquido o un gas.

Antes de 1967, el desarrollo de la cromatografía de gases y la de capa fina fue considerable, ya que hasta ese entonces, la cromatografía de líquidos en columna se consideraba como una técnica lenta e ineficiente.

No obstante, a partir de esa fecha se ha observado un repunte dentro del análisis químico debido a la introducción de sistemas más eficientes y un nuevo entendimiento del fenómeno realizado.

En la actualidad, los tres tipos de cromatografía son aplicados en el trabajo diario de análisis químico con sus respectivas ventajas y limitaciones. Dentro del análisis farmacéutico, su aplicación comprende desde la identidad de compuestos, determinación cuantitativa de la pureza de materias primas hasta la cuantificación de activos dentro de los productos farmacéuticos; ya sea en forma rutinaria como parte del control integral de calidad o en estudios de estabilidad y biodisponibilidad.

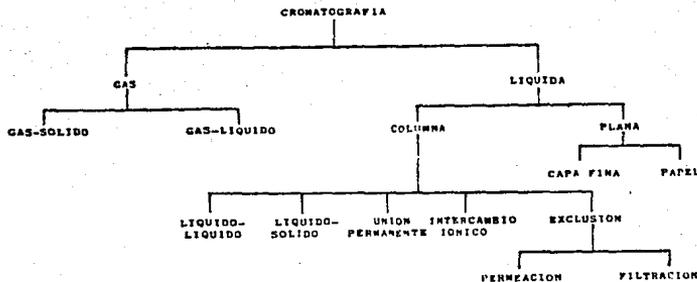


FIG.1.1. Clasificación de la cromatografía.

1.2. Cromatografía de líquidos moderna^{7,17}

La Cromatografía de líquidos moderna o Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica que utiliza altas presiones - para conducir un disolvente (fase móvil) a través de una columna rellena - con partículas diminutas de 5-10 μm de diámetro (fase estacionaria) y --- mediante un fenómeno de migración diferencial, ya sea de adsorción o reparto, se realiza la separación de una mezcla de sus componentes principales.

Los parámetros más importantes que deben tenerse en cuenta en esta técnica son:

Tiempo de retención. (T_r). Es el tiempo que permanece la muestra dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se - introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal (fig. 1.2) .

Tiempo muerto. (T_0). Es el tiempo requerido para eluir una --- muestra no retenida en la columna.

Anchura de la base de las señales. (W). Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica.

Resolución. (R_s). Es una medida cuantitativa de la separación de una muestra. La resolución entre dos bandas adyacentes esta definida --- por la siguiente expresión:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

Donde t_1 y t_2 son tiempos de retención de los componentes 1 y 2; y w_1 , w_2 son la anchura de base de los mismos componentes (fig. 1.2).

Número de platos teóricos. (N). Un plato teórico es uno sólo de los equilibrios de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados. Midiéndose con la siguiente fórmula:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

Donde t_r y w son los tiempos de retención y anchura de banda de un compuesto dado, respectivamente.

Factor de capacidad. (k'). Es la relación de distribución de una muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Expresandose de la siguiente forma:

$$k' = \frac{x_s}{x_m} = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$$

En donde, x_s y x_m son las fracciones del soluto contenidas en la fase estacionaria y la fase móvil, respectivamente; t_r es el tiempo de retención y t_0 es el tiempo muerto de la columna.

Factor de selectividad. (α). Es la relación que existe entre los volúmenes de retención de dos solutos. Esta determinado por interacciones soluto-disolvente, soluto-fase estacionaria, y por la forma y tamaño molecular del soluto. Se representa de la siguiente forma:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Donde k'_2 y k'_1 son el factor de capacidad de los componentes 1 y 2, respectivamente.

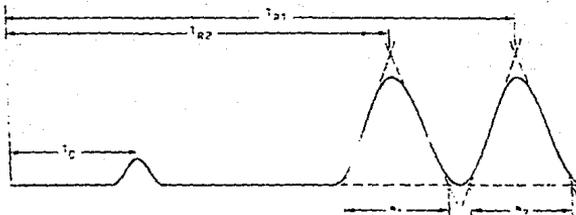


Fig.1.2. Cromatograma típico.

1.3. Clasificación de la cromatografía de líquidos de alta resolución.¹⁷

La Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) está basada en diferentes modos de interacción entre la fase móvil, la fase estacionaria y la muestra. Estas diferencias se clasifican en cuatro tipos de Cromatografía:

- a) líquido-líquido
- b) líquido- sólido
- c) intercambio iónico
- d)exclusión molecular

La Cromatografía líquido-líquido consiste de la distribución - de la muestra entre dos líquidos inmiscibles, uno de ellos esta unido a un soporte sólido en forma de película (fase estacionaria); y el otro, constituye la fase móvil.

El inconveniente de esta técnica al principio fue la solubilización de la fase estacionaria en la fase móvil, deteriorando de esta ---- manera la columna y por lo mismo acarreado problemas en la separación de los componentes de la mezcla.

Para resolver en parte este inconveniente, se ha desarrollado una variante a esta técnica. Esta variante consiste en unir químicamente - grupos funcionales al soporte de la columna. La naturaleza de dichos ---- grupos funcionales permite que se manejen columnas desde polares hasta las no polares, pasando por las de mediana polaridad.

En la Cromatografía líquido-sólido o Cromatografía de adsorción se sabe que existe una competencia entre la muestra y la fase móvil por - los sitios "activos" de la fase estacionaria. En general, como fases estacionarias se utilizan materiales de alta polaridad, p. ej., sílica gel o alúmina.

El uso de esta técnica se restringe a materiales polares cuyas propiedades de adsorción estén plenamente definidas, resultando inadecuada para compuestos muy similares.

La separación por Cromatografía de intercambio iónico se ---- realiza mediante la competencia entre la fase móvil y la muestra por los - sitios activos representados por cargas iónicas netas. Estos sitios activos son de naturaleza iónica, positiva o negativa; en general, consiste en -- ácidos orgánicos o aminas cuaternarias que están unidas a un soporte sólido.

Por lo tanto, es de suponerse que dicha técnica esté orientada a la separación de sustancias con cargas iónicas, que por su tamaño, densidad y estructura dan la diferencia de afinidad a los sitios activos.

Por último, la Cromatografía por exclusión molecular es realizada mediante la diferenciación por tamaños moleculares, esto es, existe una filtración molecular. Se retienen las moléculas grandes y pasan las moléculas pequeñas.

Esta técnica se usa en la industria de polímeros, presenta una distribución de pesos moleculares, también se usa en la separación de proteínas y otros componentes de extractos tisulares.

1.4. Instrumentación.^{16,17,22,23}

La instrumentación de la Cromatografía de Líquidos de alta resolución varía dentro de un esquema general, unos más refinados que otros de acuerdo al requerimiento del análisis. A cada uno de estos accesorios se le exige versatilidad, rapidez, reproducibilidad y sensibilidad dentro de los análisis. De aquí, la preocupación de los fabricantes en ofrecer equipos más modernos, refinados y de acuerdo a las necesidades de análisis dentro del ámbito farmacéutico.

En la figura 1.3. se esquematizan las partes más importantes que constituyen el Cromatógrafo de líquidos. Y a continuación se detallan cada una de las partes.

1.4.1. Columnas.

En todo sistema cromatográfico se dice que la columna es el corazón, en cuanto a funcionalidad se refiere; dado que es aquí donde se lleva a efecto la separación de los componentes de una muestra dada.

Las columnas más comunmente usadas en la actualidad están constituidas por un segmento de tubo de acero inoxidable empacado con un material sólido de tamaño uniforme de 5- 10 μm de diámetro, que constituye la fase estacionaria. Las dimensiones de la columna varían entre 10 y 50 cm de largo y 0.2 a 0.4 cm. de diámetro interno de acuerdo a las necesidades de trabajo.

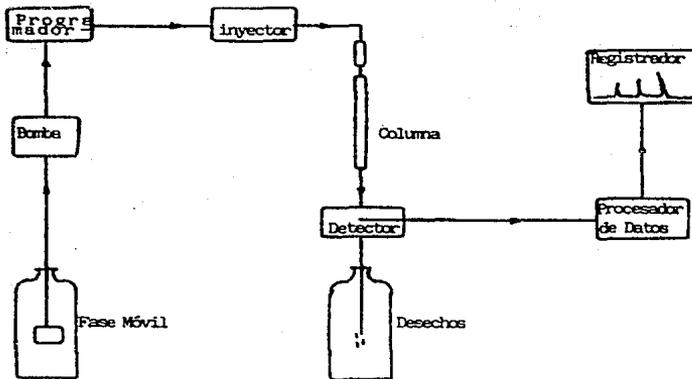


Fig. 1.3. Diagrama esquemático de la Instrumentación de CLAR.

El material con el cual se empaca la columna esta constituido por pequeñas partículas sólidas de tamaño uniforme entre 5- 10 μm de diámetro, su naturaleza química varía de acuerdo al tipo de cromatografía con la que se trabaje. Esto es, existen materiales de empaque para cromatografía de líquido-líquido, líquido-sólido, intercambio iónico y exclusión molecular.

Es de tomar en cuenta que existen variantes en el mismo material de acuerdo al fabricante, esto quiere decir que en el mercado existen más de cuatro tipos de columnas con el mismo grupo funcional, es decir del mismo material desde el punto de vista químico, excepto que pueda variar el tamaño de la partícula, la longitud de la columna, porosidad, etc., dependiendo del fabricante.

En términos generales, las columnas de cromatografía de líquidos disponibles en la actualidad, pueden clasificarse dentro de tres grandes grupos: polares, no polares y de intercambio iónico. Las primeras conocidas también como normal están constituidas principalmente por partículas de sílice. Las segundas conocidas como fase inversa, constituidas por partículas de sílice enlazadas en forma covalente con radicales no polares. y por último, las de intercambio iónico están constituidas por partículas de sílice enlazadas covalentemente con radicales que contienen grupos funcionales constituidos por ácidos o bases orgánicas (ver tabla 1.1.) .

ADSORBENTE	NOMBRE	PROVEEDOR	TAMAÑO DE PARTICULA (μm)	SUPERFICIE O GRUPO FUNCIONAL
POLAR				
SILICE	μ - PORASIL	WATTERS	10	<u>300 - 350</u>
SILICE	SILICA A	PERKIN ELMER	13 ± 5	<u>400</u>
SILICE	LICHROSORB Si - 60	E. MERCK	5,10	<u>500</u>
NO POLAR				
μ - PORASIL	μ - BONDAPACK C ₁₈	WATTERS	10	OCTADECILLO
LICHROSORB	MICROPACK CN	VARIAN	10	NITRILLO
μ - PORASIL	μ - BONDAPACK FENIL	WATTERS	10	FENILLO
SILX - I	AMINO SILX-I	PERKIN ELMER	13 ± 5	AMINO
INTERCAMBIO IONICO				
LICHROSORB	LICHROSORB KAT	E. MERCK	10	-SO ₃ ⁻
VIDAC TP	VIDAC TP CATION	SEPARATION CORP.	10	-SO ₃ H
PARTISIL	PARTISIL SAX	APPLIED SCI. LAB.	10	-NR ₃ ⁺
SORBAX SIL	ZORBAX SAX	DUPONT	6	-NR ₃ ⁺

TABLA 1.1. Materiales de empaque más comunes en CLAR.

1.4.2. Bombas.

Las columnas al estar empacadas con un material de tamaño muy pequeño producen una gran resistencia al flujo de la fase móvil, por lo que es necesario contar con un sistema de bombeo que facilite este flujo.

De acuerdo a características de funcionamiento y diseño se consideran dos tipos de bombas: las bombas neumáticas y las bombas mecánicas. A su vez, las bombas mecánicas se dividen en bombas recíprocas y bombas de desplazamiento continuo.

Las bombas neumáticas se basan en el desplazamiento del líquido una vez que se le aplica la presión de un gas inerte, ya sea en forma directa sobre el líquido o sobre el recipiente que lo contenga (fig. 1.4.a).

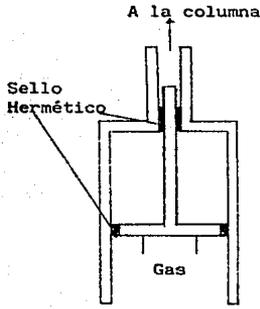
Los flujos obtenidos están libres de pulsaciones, son de presión constante (hasta 6000 psi*) y muy reproducibles.

Debido a sus grandes limitantes, entre las que se encuentra la capacidad limitante del volumen que puede bombear y la difusión del gas a través del líquido, este tipo de bombas no son muy populares y su uso se limita a ciertos aparatos obsoletos.

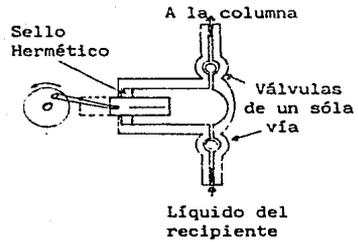
Las bombas mecánicas del tipo recíproco (fig.1.4.b) son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua sino más bien pulsante. Estas bombas tienen pequeñas cámaras con pistones recíprocos bombeando el disolvente a través del sistema CLAR. Ofrecen un flujo de volumen constante y la máxima presión obtenida por tal sistema es de 9000 psi.

Como desventaja de dicho sistema de bombeo se presenta la falta de continuidad y uniformidad del flujo debido a las pulsaciones del bombeo, que como consecuencia provoca la pérdida de eficiencia de la columna e

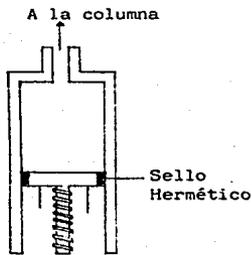
* psi - lb/pulg², equivalente a 0.068 atmósferas



a. Neumática.

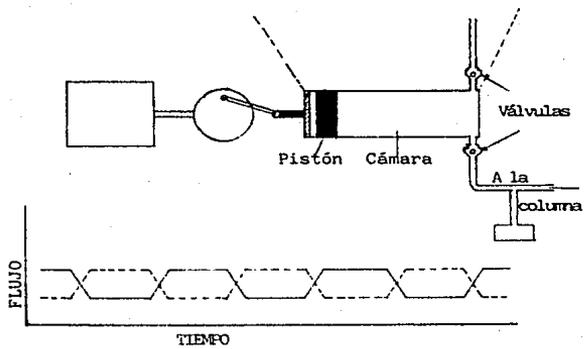


b. Recíproca



d. Por desplazamiento.

FIG. 1.4. Tipos de Bombas.



c. Recíproca de doble pistón.

inestabilidad de la señal del detector.

En la actualidad, como un avance en el diseño de estas bombas se ha creado un sistema de doble pistón, que elimina las pulsaciones mediante la intercalación del trabajo de ambos pistones y, como consecuencia, brinda un flujo más constante (fig.1.4.c) . Este sistema presenta grandes ventajas y esta siendo utilizado muy frecuentemente en los instrumentos modernos.

Las bombas mecánicas de desplazamiento continuo son aquellas en donde el émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido en una cámara de cierto volumen, el líquido fluye a través de una abertura hacia el sistema (fig. 1.4.d) .

El flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo; pero la capacidad de la bomba es limitada, su costo es elevado. Existe cierta dificultad al llenar o rellenar la bomba con la fase móvil nueva.

Hoy día, pocos son los instrumentos que emplean este tipo de bombas debido a su alto costo y, por otro lado, las ventajas que ofrecen las bombas de tipo recíproco de doble pistón.

1.4.3. Programadores de fase móvil.

Este sistema es considerado como el equivalente al programador de temperatura en Cromatografía de gases. Consiste en un aditamento eléctrico que acopla el funcionamiento de dos bombas que conducen disolventes al sistema cromatográfico.

Al acoplar las dos bombas que contienen dos disolventes de -- diferentes polaridades se realizan cambios en la composición de la fase -- móvil resultante. Estas variaciones se conocen con el nombre de elución -- por gradiente.

Existen tres tipos de programadores usados en la generación de gradientes. El primero utiliza curvas de composición preestablecidas donde se selecciona el tiempo de inicio y terminación del gradiente. El segundo funciona en base a un programa modelo donde la curva esta segmentada y, en forma independiente, se cambia la composición del disolvente y el tiempo - requerido en cada uno de los segmentos.

El tercer tipo lo forman los programadores que utilizan micro-procesadores de datos para el control de la velocidad de flujo, composición y otras funciones colaterales.

1.4.4. Inyectores.

Un factor muy importante en la obtención de un buen perfil --- cromatografico es la introducción de la muestra en la columna de cromato--- grafía. Además una mala inyección provoca variaciones cuantitativas de --- gran estimación.

Existen tres métodos de inyección de muestra, uno por inyección directa, otro mediante el uso de una válvula y por último, el más moderno, por inyección automática.

La inyección directa se realiza atravesando con una jeringa -- especial un septum sellador colocado en la parte anterior de la columna.-- La perforación se lleva a efecto con una jeringa resistente a las presiones, aprox. 1500 psi. Los materiales del septum son de silicón, neopreno y ----

elastomeros de flúor (fig.1.5.a) .

La inyección realizada con válvulas utiliza una llave de paso que alimenta a la columna. En la figura 1.5.b. se esquematiza el modo de accionar de dicha válvula en su forma receptiva y cuando se introduce la muestra.

El diseño corresponde a cada fabricante. Resisten presiones -- hasta de 2000 psi, siendo las inyecciones reproducibles, rápidas e independientes, hasta cierto punto, del operador.

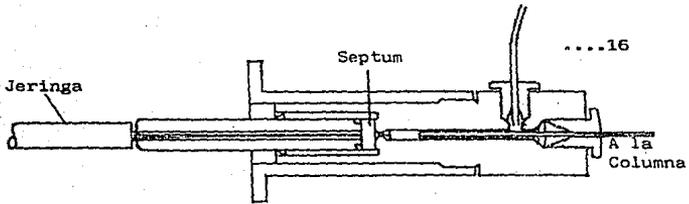
En la inyección automática, como lo dice su nombre, se utilizan mecanismos automáticos por medio de la operación de microprocesadores. El mecanismo por el cual se toma la muestra es el mismo que se utiliza en la inyección por válvula (fig.1.5.c) .

La inyección automática es utilizada para los análisis rutinarios de control de calidad, donde existe la posibilidad de acoplarlos a un sistema computarizado.

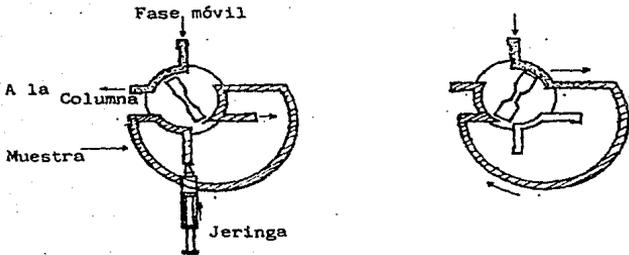
1.4.5. Detectores.

Durante mucho tiempo, el desarrollo de la Cromatografía de --- líquidos se ha visto obstaculizado por la falta de detectores adecuados. - Se considera que un detector ideal debe ser altamente sensible, estable en sus lecturas, producir una lectura continua y con una respuesta universal.

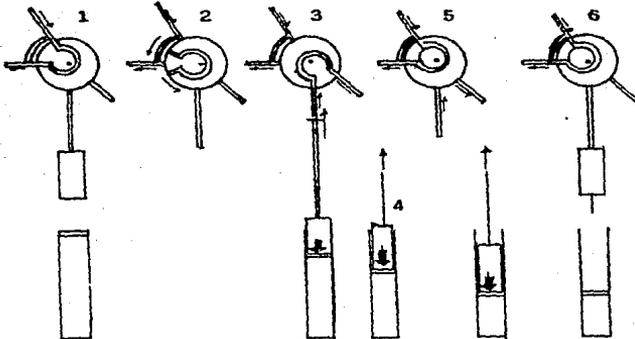
Desafortunadamente, el desarrollo de un detector universal ha resultado imposible, lo que provoca que en la determinación de los componentes de una mezcla se busque aquel detector con la mayor sensibilidad - posible.



a. Inyección Directa.



b. Inyección con válvula.



c. Inyección Automática.

FIG. 1.5. Tipos de Inyectores.

Los detectores más frecuentemente usados son: uno que funciona en base a diferencias entre el índice de refracción de la fase móvil y otro que depende del espectro de absorción de luz U.V./Visible de los componentes de la mezcla.

El detector por diferencia en el índice de refracción establece la diferencia del índice de refracción entre el eluyente de la columna conteniendo la muestra y la fase móvil de referencia en estado puro.

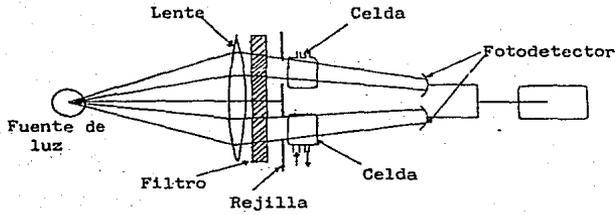
Este tipo de detector presenta poca estabilidad de señal, es moderadamente sensible, no es destructivo y es fácil de manejar. Además, presenta diversas ventajas en trabajos de permeación en gel y separaciones preparativas.

Su uso en análisis se ha limitado por la inestabilidad de respuesta ante cambios de temperatura y flujo. Por lo mismo, se ha eliminado en técnicas de control de trazas o en eluciones por gradientes.

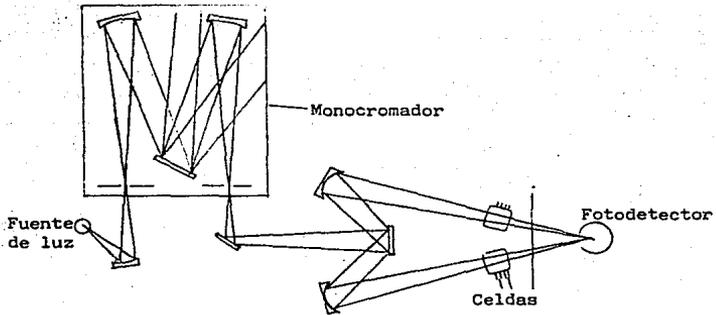
Otro tipo de detector es el espectrofotometro U.V./Visible, el cual consiste en la determinación del espectro de absorción de luz en la zona ultravioleta por parte del compuesto de interés.

Se conocen dos tipos de detectores de esta clase, uno que opera a longitud de onda fija y otro que utiliza longitud de onda variable (fig. 1.6). Ambos son selectivos, dado que sólo determinan la presencia de aquellas sustancias que absorben luz ultravioleta o visible.

Como se esquematiza en la figura 1.6, el detector U.V./Visible de longitud de onda fija consiste en una lente de cuarzo que dirige los rayos luminosos de una lámpara de deuterio hacia un filtro de luz, que a su vez los orienta hacia dos celdillas que contienen la muestra y aire como referencia. La luz resultante es captada por un fotodetector que emite una señal eléctrica cuyo resultado se traduce en la emisión de una gráfica.



a. Detector U.V. de Onda Fija.



b. Detector U.V. de Onda Variable.

FIG.1.6. Detectores por espectrofotometría U.V./Visible.

El detector es barato, sensible y con mínimas variaciones ante cambios de flujo, temperatura, etc.. La versatilidad que representa dicho detector radica en el hecho de que los filtros son intercambiables; obteniéndose, así, varias longitudes de onda.

Otro tipo de detector es el de longitud de onda variable que utiliza una rejilla especial que selecciona la longitud de onda requerida entre un rango de 200 y 800 nm. El mecanismo por el cual se obtiene el cromatograma es el mismo que se describió para el detector de onda fija.

Debido a que este tipo de detector permite la selección de una amplia gama de longitudes de onda en la zona ultravioleta y visible, su aplicación se ha visto incrementada. Más aún, se ha observado un aumento de la sensibilidad hacia ciertos productos y una disminución en las interferencias debidas al aparato (fig.1.6.b) .

1.4.6. Registradores y procesadores de datos.

Son aditamentos que hasta cierto punto, son opcionales. Son registradores del tipo estándar, que reportan las señales eléctricas procedentes del detector en forma gráfica.

Dependiendo de la refinación del aparato se utilizan los procesadores de datos, los que brindan una mejor presentación de los cromatogramas. Los procesadores de datos convierten la señal eléctrica a una señal digital, filtrando y eliminando los picos extraños, corrigiendo la línea basal del detector y, por tanto, tiende a producir una gráfica muy limpia. Además, los reportes tienden a ser más reproducibles y confiables.

1.5. Desarrollo de un método de análisis por cromatografía de líquidos.^{23,25}

Una vez conocida la operatividad del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), el potencial de análisis depende de la habilidad del químico para evaluar y equilibrar los factores que intervienen en el proceso analítico.

Estos factores están constituidos por: la naturaleza físico--química de las sustancias de la muestra, del sistema cromatográfico y por las necesidades del análisis, ya sea en las áreas de control de calidad, - estudios de estabilidad de medicamentos, etc.. Además, deben presentarse - los requerimientos básicos en el proceso de separación para el desarrollo de métodos de análisis sea tan simple y vérsatil como sea posible.

Optar por un proceso de separación y cuantificación cromatográfica no necesariamente reviste métodos complejos o la utilización de aparatos altamente refinados, sino más bien requiere de la ponderación de las - características implicadas en el proceso. Tal consideración reviste el -- análisis crítico de cada una de las partes que constituyen el proceso ---- cromatográfico.

Como primera etapa, en el proceso de desarrollo de un método - de análisis por CLAR, se encuentra el estudio de cada una de las características de la muestra a trabajar. Dichas características son: la solubilidad, peso molecular, fuerza iónica, pH de solución, grupos funcionales dentro - de la estructura molecular, etc.; es además muy importante conocer el ---- espectro de absorción de luz ultravioleta y visible, pues se puede elegir la mejor longitud de onda para los compuestos de la mezcla.

Esta información resulta valiosa en la selección de las condiciones iniciales de la cromatografía. Esto quiere decir que conociendo las propiedades fisicoquímicas de la muestra se determinará estinadamente la -- columna, eluente, detector y método de cunatificación adecuados a la muestra.

El siguiente paso, es establecer los parámetros más idóneos -- dentro del proceso de separación, como: fase estacionaria, características de la columna, flujo, composición de la fase móvil, etc..

La elección del disolvente de la fase móvil se realiza en forma empírica, de acuerdo a anteriores experiencias; sin embargo, algunos autores se han preocupado por tales problemas y han realizadò compilaciones de datos que establecen un camino más rápido para la selección de la columna y fase móvil en base al peso molecular y la polaridad de la muestra problema. Un ejemplo de dichos resúmenes lo representa la figura 1.7.

En el análisis de mezclas de compuestos, además de la identificación de los parámetros cromatográficos, es importante la obtención de la mejor resolución cromatográfica de la muestra. Esto es posible reali--- zando cambios experimentales en la fase móvil, concentración de la muestra, composición de la fase estacionaria (grupos funcionales que incluyen), -- dimensiones de la columna, velocidad de flujo de la fase móvil, fuerza--- iónica del disolvente, temperatura y efectos químicos especiales. Al reali--- zar tales cambios, p. ej., se modifica la estructura iónica de la muestra o se favorece la solubilidad alterando, de este modo, las interacciones -- entre columna-muestra y muestra-fase móvil.

En resumen, para establecer un método de análisis por CLAR se analizará experimentalmente cada uno de los siguientes parámetros: muestra,

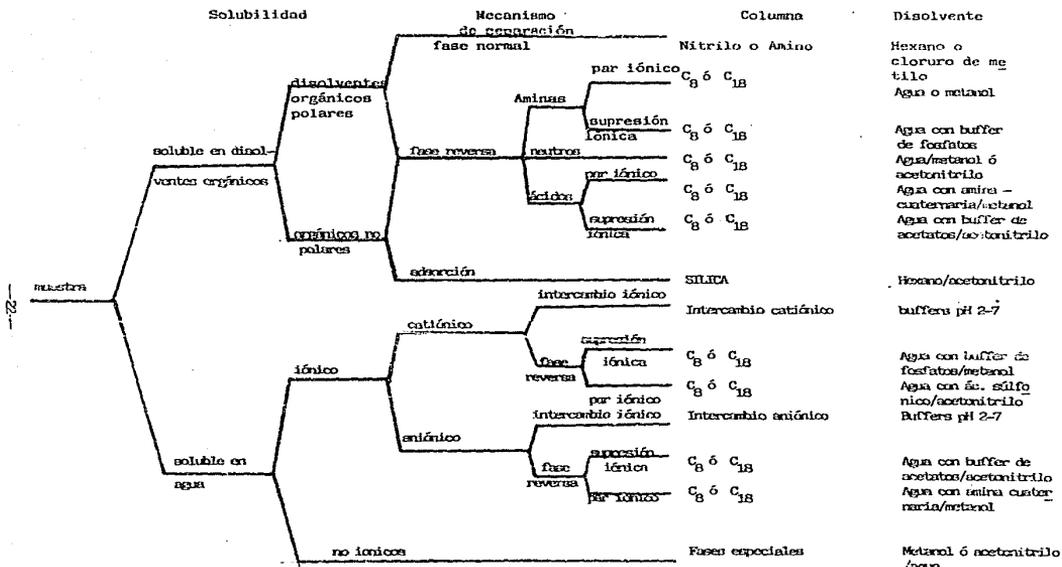


FIG.1.7. Selección de la fase estacionaria y fase móvil.

sistema cromatográfico y resolución de compuestos. A fin de evaluar y -- equilibrar cada uno de los factores de estos elementos y establecer un -- método analítico más racional.

1.6 Métodos de cuantificación.²⁵

El aspecto más importante dentro de la cromatografía de líquidos es, sin duda alguna, la habilidad de analizar cuantitativamente una -- variedad bastante amplia de compuestos farmacéuticos.

Hasta que no se dispuso de un equipo dispensador de fase móvil fino, esto es sin pulsaciones, se dificultó el uso de esta técnica en la -- cuantificación de sustancias, sin embargo hoy día se ha transformado en una técnica altamente precisa y exacta. Por lo que su utilidad se ha extendido al análisis de mezclas complejas.

Existen dos aproximaciones para cuantificar la señal del detector o pico cromatográfico. La primera, consiste simplemente en medir la -- altura del pico; la segunda envuelve la medición del área del pico cromatográfico.

En la medición de la altura simplemente se reporta la distancia entre la línea base al máximo del pico. Las alturas de los picos son fácilmente determinadas por el uso de una regla. En algunos casos, se cuenta -- con integradores y computadoras que facilitan tal operación. La ventaja de este procedimiento radica en que cuando se presentan defectos en la línea base suelen corregirse. Sin embargo, es preferible contar con una línea -- estable para obtener un mayor grado de precisión.

El método de áreas, como su nombre lo indica, está basado en -- la determinación del área del pico cromatográfico de la sustancia de interés.

En el transcurso de la evolución de éste método, se han manejado varios tipos de evaluación, desde los más rudimentarios hasta los -- más refinados, pero a raíz de la tendencia de los aparatos modernos hacia la integración por computadoras, los métodos manuales anteriormente utilizados han caído en desuso.

Dado que la CLAR es un método comparativo de análisis existe la necesidad de calibrar el sistema de medición. Por lo que se conocen -- dos métodos de calibración, uno por estandarización externa y, el otro, -- por estandarización interna.

El primero consiste en evaluar externamente el comportamiento de la sustancia de interés ante el sistema analítico establecido, para lo cual debe usarse una sustancia de referencia de calidad reconocida. La -- evaluación consiste en correlacionar la respuesta analítica obtenida por la sustancia de referencia y su respectiva concentración, con su respectivo comportamiento lineal.

El segundo método llamado de estándar interno, consiste en la adición de un compuesto conocido a la muestra por analizar y a la solución estándar. La cuantificación se hace en base a la relación entre áreas tan to de la solución estándar como de la muestra, adicionadas de la misma sus tancia que recibe el nombre de estándar interno. La sustancia que se usa como estándar interno ha de cumplir varios requerimientos, entre otros: -- a) ausencia de interferencia; b) resolución del compuesto de interés y -- otros componentes de la muestra; c) estabilidad, y d) solubilidad en la -- muestra.

2. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

2.1 Antecedentes.¹²

La base del concepto de validación de métodos analíticos tiene sus orígenes a partir de tres comunicados emitidos por la FDA*. El -- primero de ellos, 1906, exige a los fabricantes de productos farmacéuticos evitar su adulteración. El segundo, 1938, convoca a los mismos a eliminar de las formulaciones aquellas sustancias que pudieran causar algún -- efecto tóxico, esto es, brindar seguridad al momento de usar un medicamento. El último de ellos, en 1962, pide comprobar plenamente la eficacia de un producto farmacéutico como resultado del problema ocasionado por la talidomina y sus efectos teratogénicos.

A partir de esta fecha, se creó por primera vez en la historia, una reglamentación que se enfoca a las prácticas correctas de manufactura de medicamentos (GMP's).

Durante el estudio de esta reglamentación, queda clara la necesidad de establecer en forma correcta los procedimientos de manufactura y control de medicamentos. Esto es, considerar todos aquellos factores -- que contribuyen a la calidad en los procesos de fabricación, así como la -- reproducibilidad del producto de lote a lote. La demostración de que es-- tos procedimientos son correctos se conoce con el nombre de VALIDACION.

Sin embargo, fue hasta 1984, después de una serie de acuerdos entre la FDA y asesores de la industria farmacéutica, que se establece una reglamentación de fácil entendimiento y aplicabilidad acerca de las buenas prácticas de manufactura. Igualmente se establece el significado del proceso de validación, criterios y limitantes para considerar la validez de -- un proceso.

*FDA - siglas de Food and Drug Administration.

2.2 Definición.

De acuerdo a las buenas prácticas de manufactura, en terminos generales, la validación es considerada como: "revisión sistemática de las instalaciones y etapas esenciales de trabajo en el desarrollo, producción y control de productos farmacéuticos, con el objetivo de asegurarse de que los productos fabricados pueden ser elaborados con seguridad y pueden ser reproducidos en la calidad deseada si se observan los métodos establecidos de producción y control". (6.)

Ahora bien, al formar parte de este proceso, la validación de métodos analíticos se autodefine como el procedimiento por el cual se establece la exactitud, variabilidad, interferencias, posibles errores y especificidad del método. Así pues, la validación de métodos analíticos tiene como objetivo comprobar determinados parámetros experimentales a fin de poder valorar su influencia sobre el resultado de los análisis.

2.3 Parámetros de validación^{2,3,27}

Para la validación de los métodos analíticos se consideran los siguientes parámetros:

Exactitud. Un proceso de desarrollo de métodos analíticos comienza al establecer que es lo que se medirá y que tan exacta es la medida. A él le sigue un proceso de validación que da el grado de concordancia entre los valores de análisis determinados y el valor real, es decir su exactitud. La exactitud está íntimamente relacionada con la selectividad y especificidad del método; es decir, la discriminación realizada entre lo analizado y los precursores sintéticos, contaminantes de proceso y productos de degradación.

La exactitud implica la existencia de errores sistemáticos, - pero debemos estar concientes de que un método nunca puede ser 100% exacto, ya que siempre existe un grado de variación. Para evaluar la exactitud debemos determinar la función matemática que relaciona la concentración real - del fármaco con la respuesta específica que estamos detectando. Para inferir que el método es exacto el grado de ajuste o correlación entre estas - dos variables debe ser muy cercano a 1.0 .

Precisión. Como definición encontramos que la precisión representa la capacidad de un método para obtener resultados que presentan una dispersión típica tras una repetida aplicación del mismo, es decir, describe el error eventual. Se evalúa de dos formas:

1^a Midiendo la concordancia respecto al valor real de determinaciones independientes, realizadas por un sólo analista usando los mismos aparatos y técnicas, es decir, resultados obtenidos por un método con -- iguales condiciones de trabajo.

2^a Midiendo el grado de aproximación entre los valores individuales obtenidos con el mismo método y material de pruebas idéntico bajo - ciertas condiciones diferentes: diferente operador, diferente aparato, -- diferente laboratorio y diferente tiempo.

Tolerancia del método de análisis. Es la cualidad de los métodos de dar resultados confiables cuando se les lleva a cabo con ligeras -- alteraciones, por ejemplo, variación del tamaño de partícula, cambios en la temperatura, uso de reactivos de calidad diferente, uso de columnas cromatográficas de longitud diferente o con fase estacionaria diferente, etc.. La tolerancia se establece sometiendo el método a cambios que se juzgan probables.

Especificidad. Se llama especificidad a la cualidad de los -- métodos analíticos cuyos resultados se deben exclusivamente al componente de interés; es decir, que las demás sustancias presentes en el producto no interfieren, ni en forma inhibitoria ni aditiva, con la valoración. La -- validación deberá establecer claramente la especificidad de respuesta del compuesto de interés con respecto a:

1. Los excipientes del producto no interfieren en el ensayo
2. El ensayo de la sustancia en análisis no se ve afectado -- por otros productos secundarios conocidos.

2.4 Realización de una validación:⁶

Para llevar a cabo una validación se requiere:

- Disponer de un método de análisis bien definido
- Contar con muestras representativas
- Tener los instrumentos bien calibrados
- Presentar un plan de ensayo detallado para evitar un doble trabajo
- Estar a cargo de especialistas
- Realizar la validación con costos favorables

2.5. Criterios sobre validación de métodos analíticos.

Existen muchas formas de validar un método analítico, ya que hay una variedad de experimentos que pueden utilizarse para tal fin. El ponderar las pruebas necesarias y reconocer los criterios de evaluación para validar un método depende de las necesidades de cada laboratorio, del área en que se aplique, de los requerimientos gubernamentales y algunas veces del criterio mismo de la persona que la realiza. Sin embargo, en esencia, la validación tiene por objeto determinar la exactitud, precisión y especificidad tanto del sistema analítico como del procedimiento de análisis.

A continuación se presentan las pruebas necesarias y los criterios de evaluación para considerar validado un método, que son el resultado de un análisis crítico de los conceptos manejados hoy en día.^{1,2,3,6,16}

Exactitud del sistema.

En todo proceso de validación es indispensable evaluar la exactitud del sistema sobre todo por tratar de establecer el posible efecto de los excipientes sobre la adecuada correlación entre la respuesta del detector y la concentración real del fármaco.

Para determinar la exactitud del sistema se evalúa el comportamiento de diferentes niveles de concentración de la sustancia de referencia ante la respuesta del detector. Por lo general, estos niveles fluctúan entre un 50 hasta un 150 % de la cantidad etiquetada.

Dicha evaluación se realiza a partir del análisis de la gráfica resultante de datos obtenidos experimentalmente y la respuesta del detector, utilizando, además, los siguientes parámetros estadísticos: intercepto (b) y coeficiente de correlación (r) .

Se considera que el sistema es exacto cuando se demuestra que el valor de coeficiente de correlación está muy cercano a 1 y cuando el valor del intercepto de la curva es muy cercano a 0.

Precisión del sistema.

Para evaluar la dispersión o variación de los datos experimentales es necesario establecer la precisión del sistema. Dicha precisión se establece a partir de un número determinado de repeticiones del análisis a soluciones de referencia a un 100 % del nivel esperado.

Los resultados, así obtenidos, se someten a una evaluación estadística, la cual consiste en comparar la media del porcentaje de recobro y el coeficiente de variación.

Se considera que un sistema es preciso cuando el valor de la media del porcentaje de recobro está muy aproximado al 100 % y el valor de coeficiente de variación este por debajo del 2 % .

Exactitud del método.

Para garantizar que el contenido del fármaco, dentro de una formulación dada, se halla lo suficientemente apegadas a los valores reales, es necesario manejar otro tipo de experimento dentro de la validación de métodos. Dicho experimento lo constituye la determinación de la exactitud del método.

Bajo este rubro entendemos que para determinar el grado de concordancia de valores experimentales con respecto al valor real, es indispensable considerar que la exactitud del método es afectada por dos factores: 1) La cantidad de muestra y 2) La relación excipiente-fármaco.

Para determinar el efecto que tiene la cantidad de la muestra se sugiere evaluar la correlación entre los valores experimentales y valores reales obtenidos en diferentes niveles de concentración. Estos niveles pueden fluctuar desde un 50 hasta un 150 % del nivel esperado en el análisis. Más aún, se refuerza con una evaluación estadística mediante la determinación del coeficiente de correlación y el intercepto de la curva obtenida.

Para determinar el siguiente punto, relación excipiente-fármaco, es necesario manejar el método de placebo adicionado, el cual consiste en adicionar estándar de referencia al placebo de la formulación. Por lo general, los niveles de concentración fluctúan entre el 80 y 120 % de la cantidad etiquetada. Al final se evalúan estadísticamente la media, desviación estándar y coeficiente de variación de los valores obtenidos.

Una vez que se conocen los efectos de estos dos factores se puede inferir sobre la exactitud en base a los siguientes criterios:

1. sobre el efecto que tiene la cantidad de muestra. Con valores de coeficiente de correlación cercanos a 1 e intercepto aproximadamente igual a 0, se acepta que la variación de concentración dentro del rango trabajado no altera la exactitud del procedimiento analítico.
2. Sobre el efecto excipiente con relación al fármaco. Al obtener valores similares de media, desviación estándar y coeficiente de variación, se puede inferir que el efecto del placebo sobre la exactitud del método es despreciable.

Precisión del método.

Finalmente, cuando es aplicado un método de análisis para la - determinación del contenido del fármaco, las determinaciones que se hagan a una muestra deberán ser constantes en sus valores, esto es repetibles y reproducibles dentro de un marco similar de condiciones. A la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad se ha convenido en denominar como la - precisión del método.

Para establecer la precisión del método es necesario recurrir a dos métodos:

1. Analizando muestras en un número dado de veces por un sólo analista con las mismas condiciones de trabajo. Evaluando - media, desviación estándar y coeficiente de variación de -- los datos obtenidos.
2. Analizando muestras en un número determinado de veces por - dos analistas y en diferentes días de análisis con el mismo método. Evaluando media, desviación estándar y coeficiente de variación de los datos obtenidos.

Para aceptar la aplicabilidad del método de análisis es indis- pensable que los datos antes mencionados sean similares, estadísticamente hablando. Además, que los valores de coeficiente de variación estén por -- debajo del 2 % .

Especificidad.

Otra parte importante dentro de la validación de métodos analí- ticos, lo constituye el hecho de eliminar aquellas interferencias que ---- tengan su origen dentro de la formulación misma o bien de deban a degrada- ciones resultantes de un período de almacenaje del producto. En otras pala- bras, se trata de garantizar que el método sea aplicable en forma específica

al fármaco en estudio, sin importar los excipientes o productos degradativos que estén presentes.

Para determinar esta especificidad es necesario efectuar los siguientes pasos:

1. Colocar la muestra y su placebo en estufas a temperaturas -- de 80°, 60°, 40° C y temperatura ambiente. Con la finalidad de provocar algún producto de degradación.
2. Espaciar los tiempos de muestreo a 7, 14 y 21 días para -- cada una de las temperaturas en ambas muestras.
3. Realizar el análisis mediante el procedimiento establecido.
4. Verificar que cada producto, sea de la formulación o producto de degradación, pueda ser separado del fármaco de interés.
5. Reportar las observaciones en cada uno de los casos.

Se considera que el método es específico cuando, mediante los anteriores pasos, se demuestra que es capaz de separar el fármaco de cualquier otra sustancia ajena a él.

2.6. Documentación y revalidación.

La documentación debe permitir llevar a cabo con posterioridad cada uno de los pasos de una validación. En la documentación debe constar como mínimo:

- Los parámetros de validación
- La denominación de los lotes y origen de las pruebas y sustancias de comparación
- La calidad de las sustancias de comparación
- Los instrumentos utilizados

- Los espectros, cromatogramas, curvas de registro, etc.
- Los parámetros de ajuste de aparatos
- Los resultados y cálculos

La revalidación se entiende como la repetición de una validación total o parcialmente. Resulta necesaria cuando se han alterado las -- condiciones bajo las cuales se ha realizado la validación, como:

- Modificación de los procesos de fabricación o de reactivos
- Cambios de proveedor o de calidad de los reactivos, fases estacionarias y similares
- Empleo de instrumentos nuevos
- Nuevas experiencias en la práctica

En cada caso debe decidirse hasta que punto debe repetirse un validación.

3. DESARROLLO DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE BROMHÉXINA Y DAPIRONA MAGNÉSICA.

3.1. Planteamiento del problema.

El establecer un método de análisis está en función de las necesidades de cada una de las etapas involucradas en la fabricación de un medicamento. Así pues, dentro del trabajo rutinario del Departamento de Aseguramiento de la Calidad es indispensable contar con procedimientos analíticos capaces de brindar resultados exactos y precisos con la mayor celeridad posible, a fin de dar un nivel aceptable de servicio a otras áreas productivas.

El presente trabajo pretende establecer un procedimiento de --cuantificación para Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica contenidos en una solución, a dosis terapéuticas de 1.6 y 200 mg/ml, respectivamente. Este procedimiento es desarrollado de acuerdo a los requerimientos de Aseguramiento de la Calidad, mismos que dependen de prioridades establecidas en otras áreas productivas.

A la fecha se conocen un número considerable de métodos analíticos para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica, --entre los que se destacan los siguientes: (comun. inter.)

ANALISIS VOLUMETRICO. Consiste fundamentalmente, en la valoración de grupos funcionales específicos dentro de la molécula del fármaco. Por lo mismo, para el Clorhidrato de Bromhexina suelen valorarse los cloruros de la molécula con ntrato de plata. En el caso de la Dipirona Magnésica, la valoración es realizada con solución de yodo sobre su doble enlace.

ANALISIS DIRECTO POR ESPECTROFOTOMETRIA. Consiste en la evalua ción del máximo de absorción que presenta cada sustancia aplicando la ley de Lambert-Beer en un rango de concentración a una longitud de onda definida. En nuestro caso, el Clorhidrato de Bromhexina presenta un máximo de absorción de 290 nm y la Dipirona Magnésica lo presenta a 257 nm.

ANALISIS INDIRECTO POR ESPECTROFOTOMETRIA. Dependiendo de la forma de realizarse se clasifican en:

- Análisis precedido de una extracción líquido-líquido. Consiste en una separación líquido-líquido donde el fármaco es aislado e inmediatamente cuantificado por espectrofotometría. Los sistemas de separación conocidos para aislar Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica, son los siguientes: Cloroformo-Solución acuosa alcalina, éter- solución acuosa alcalina, cloroformo-agua, -- entre otros.
- Análisis de compuestos secundarios-coloridos. Consiste en la --- formación de compuestos coloridos a partir del fármaco y su deter minación en la zona de luz visible. En el caso del Clorhidrato de Bromhexina existe una reacción de diazotación con dicloruro de N-(naftil-(1))-etilendiamino que produce un derivado rojo con máximo de absorción de 490 nm. En el caso de la Dipirona Magnésica se conoce de la reacción con p-dimetilaminocinómico que produce un derivado amarillo con máximo de absorción a 507 nm.

Estos métodos se han aplicado en diversas formulaciones, en forma separada, obteniendo buenos resultados; sin embargo, al ser aplicados a la formulación anteriormente mencionada existen interferencias tanto de un fármacocomo del otro. Además se ha probado que carecen de la capacidad suficiente para diferenciar productos de degradación y excipientes conte-

nidos en la formulación.

Por lo tanto, se pretende utilizar en este trabajo la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) como la alternativa analítica más viable y eficaz para la cuantificación de los fármacos contenidos en la solución inyectable problema.

En tal caso debemos, primero, enunciar algunas características del Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica (fig.3.1.), con la finalidad de efectuar un buen diseño y enumerar cada una de las alternativas para el desarrollo del procedimiento analítico por CLAR. Por esto, es indispensable plantear las pautas fisicoquímicas que servirán, como parte angular en la elección del método cromatográfico más conveniente. Estas pautas son las siguientes:

- a) Las solubilidades en agua a un pH cercano a 6.0 son similares en ambas sustancias
- b) La estabilidad física y química de ambos fármacos se ve afectada por condiciones semejantes
- c) La similitud de regiones de máxima absorción por espectrofotometría
- d) La existencia de zonas básicas y ácidas dentro de la misma molécula provocan comportamientos anfotéricos.

Será necesario en segundo término, una vez establecido el procedimiento por CLAR, validar conforme a las necesidades y limitaciones de -- Aseguramiento de la Calidad. Dicha validación, además de comprobar la ---- exactitud y precisión de las mediciones, pretende establecer la especificidad del método, esto es diferenciar, por un lado, el Clorhidrato de Bromhexina y 2-amino-3,5-dibromobenzaldehído (Boehringer₅); y por otro lado, -- separar los tres productos de degradación que reporta Eddine₍₁₁₎. Para ---- ambos casos estos productos de degradación se desglosan en la figura 3.2.

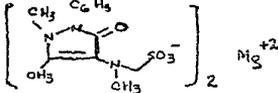
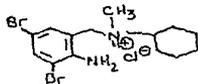
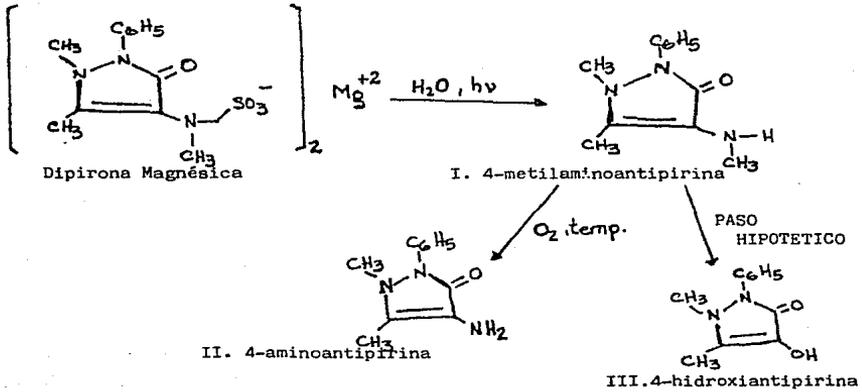
	DIPIRONA MAGNÉSICA	CLORHIDRATO DE BROMHEXINA
SINONIMOS	(2,3-dihidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4-yl)metilamino metanesulfónico ácido de magnesio	Clorhidrato de 2-amino-3,5-dibromo-N-ciclohexil-N-metilbencenmetamina.
P.M. ASPECTO	740 g/mol Polvo cristalino blanco	412.68 g/mol Polvo cristalino blanco-amarillento
PUNTO DE FUSION	--- ---	237.5 - 238.0 °C
SOLUBILIDAD	Agua, Metanol, Etanol insol. Eter, Acetona, Cloroformo	Agua caliente, Metanol, Etanol insol. Acetona, Cloroformo, Dioxano
pH DE LA SOLUCION	Acuosa al 40 % 6.0 a 7.0	Acuosa al 10 % 4.0 a 6.0
CONTENIDO DE AGUA	13.5 a 15.5 %	Menos del 1.0 %
λ_{max} . DE ABSORCION	257 nm	290 nm
COMPORTAMIENTO EN SOLUCION	En presencia de O ₂ y luz existe un proceso degradativo.	En presencia de cloruro de sodio u otro electrolito hay precipitación.
ESTRUCTURA QUIMICA		

Fig. 3.1. Propiedades fisicoquímicas de Dipirona Magnésica y Clorhidrato de Bromhexina.

A. Dipirona Magnésica.



B. Clorhidrato de Bromhexina.

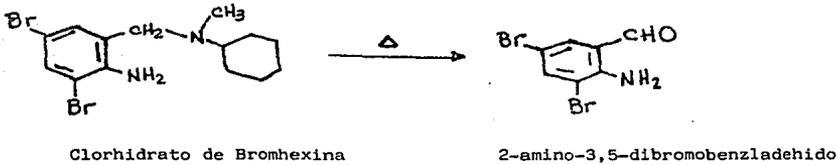


Fig. 3.2. Productos de Degradación de Dipirona Magnésica y Clorhidrato de Bromhexina.^{5,11}

Queda pues como objetivo de este trabajo:

Desarrollar y validar un método cromatográfico para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica contenidos en una solución inyectable respondiendo a las necesidades del trabajo diario de Control de Calidad. Por lo que este método debe ser preciso, exacto y específico.

Basado en la siguiente hipótesis :

Dada las propiedades fisicoquímicas, las características de los métodos analíticos por CLAR, las características del equipo de CLAR a usar y las necesidades analíticas de Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica se propone el uso de la Cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificarlos en forma precisa, exacta y específica dentro de los requerimientos del Departamento de Control de Calidad.

3.2. Material y métodos.

Equipo. Se uso un cromatógrafo de líquidos (Watters Ass., LC/GPC 204) con detector de U.V. de longitud de onda fija, 254 nm, (Watters Ass., 400), un inyector automático de muestras (Watters Ass., 710-B), un programador de disolventes (Watters Ass., 600) y un procesador de información (Watters Ass., 730). El detector fue colocado dentro de una sensibilidad de 0.2 unidades de absorbancia a escala máxima. Este equipo no cuenta con control de temperatura para la columna.

Columna. Se utilizó una columna de fase reversa de 30 cm de largo x 0.39 cm de diámetro interno, empacado con sílica unida covalentemente con octadecilsilano (μ -Bondapak C₁₈, Watters Ass.) .

Reactivos y materiales. Todos los reactivos que se utilizaron fueron grado analítico y fueron utilizados sin purificación previa. Las fases móviles para CLAR libres de impurezas al U.V. fueron filtrados a través de filtros tipo membrana de 0.22 μ m (MILLIPORE) en un equipo de filtración de disolventes (MILLIPORE, 04720) .

Además, se usó Fenacetina, Dipirona Magnésica y Clorhidrato de Bromhexina, sustancias de referencia, de calidad comprobada.

Preparación de muestras. Las muestras utilizadas en la experimentación fueron disueltos en metanol R.A. y filtradas a través de filtros tipo membrana de 0.45 μ m (MILLIPORE) .

3.3. Desarrollo Experimental.

3.3.1. Consideraciones previas.

La parte experimental esta dividida en dos partes principales:

a) Desarrollo del método de análisis, y b) Validación del método analítico. En el primero, se describen los parámetros y variaciones realizadas para el establecimiento del método de análisis aplicado a Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica utilizando Cromatografía de líquidos. En el segundo aspecto, se incluye los experimentos y criterios más comunes para realizar una validación de métodos.

Básicamente, en el desarrollo del método analítico, se consideró el punto de vista técnico como parte angular; pero hay que señalar que el costo del desarrollo y el tiempo invertido antes de llevarlo a la práctica, influyeron considerablemente. Por lo que, una vez satisfechos los criterios técnicos, se consideró la necesidad de incorporar en forma inmediata el método analítico al trabajo diario de Control de Calidad.

3.3.2. Desarrollo del método de análisis.

Para realizar el desarrollo del método de análisis se recurrió a las siguientes propiedades:

- a) Propiedades fisicoquímicas de los fármacos. Como: Solubilidad, disolventes utilizados, estructura química, grupos ácidos, básicos y neutros, y longitud de onda de máxima absorción (fig.3.1) .
- b) Propiedades fisicoquímicas de la muestra. Como: solubilidad, estabilidad física en solución y excipientes incluidos en la formulación

c) Propiedades del equipo. Como: Aplicación y funcionalidad de cada parte en relación a la muestra.

A partir de esto, dentro del desarrollo del método analítico -- por CLAR, se propuso la evaluación de dos grupos de factores. Unos, que -- por su naturaleza, fueron INDEPENDIENTES y otros, por conveniencia propia, permanecieron CONSTANTES.

A. FACTORES INDEPENDIENTES. Se consideraron independientes los siguientes parámetros:

a) Polaridad de la fase móvil. Para determinar el efecto de la polaridad de la fase móvil sobre la resolución cromatográfica que debe ser mayor de 1.5, se modifico la polaridad de la siguiente forma:

1. Realizando varias combinaciones con distintos disolventes.
Las Combinaciones que se probaron fueron: Metanol/Agua; ---
Metanol/Solución amortiguadora pH 4; Acetonitrilo/Agua; ---
Acetonitrilo/Solución amortiguadora pH 4.
2. Modificando la composición de los disolventes de la fase --
móvil. Las proporciones probadas fueron: 50:50; 60:40; ----
70:30 y 80:20 (Relación fase orgánica contra fase acuosa) .

Además de la resolución cromatográfica, se evaluaron los ----
tiempos de retención, cuyo valor debe ser menor de 15 min., y el perfil --
cromatográfico de cada uno de los fármacos contenidos en la solución inyec
table.

b) pH de la fase móvil. La variación del pH de la fase móvil se
realizó modificando el pH de la solución amortiguadora. Los valores de pH
probados fueron: 3.0, 4.0, 5.5 y 7.0 .

Igualmente, se evaluó el efecto del pH sobre la resolución ---
cromatográfica, tiempos de retención y perfil cromatográfico.

c) Concentración de sales en la solución amortiguadora. Se --- modificó el contenido de las sales en solución de la siguiente manera:

1. Adicionando Cloruro de Potasio, con lo que se logra un aumento de fuerza iónica. Se adicionó una solución 0.01 M de Cloruro de Potasio a una solución amortiguadora de Fosfato --- monobásico de potasio.
2. Variando la concentración de Fosfatos de la solución amortiguadora. Las concentraciones de Fosfatos que se probaron --- fueron las siguientes: 0.01 y 0.005 M.

De la misma manera, se evaluó la resolución cromatográfica, --- tiempo de retención y perfil cromatográfico de los fármacos estudiados.

d) Velocidad de flujo. Los valores de velocidad de flujo que --- se probaron fueron los siguientes: 1.0, 1.2 y 1.5 ml/min.

Se siguió evaluando la resolución cromatográfica, tiempos de --- retención y perfil cromatográfico de ambos fármacos estudiados.

e) Sensibilidad del detector. Para evaluar la respuesta del --- detector ante cada uno de los fármacos, se procedió a determinar el efecto de la sensibilidad en 0.01, 0.1 y 0.2 uafs (unidades de absorbancia escalar).

Se determinó, como criterio de evaluación, la resolución y el --- perfil cromatográfico.

f) Concentración de las muestras. Se varió la concentración de Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica desde un valor de 0.1 mg/ml hasta 0.064 mg/ml, para ambos fármacos. Es decir, para cada fármaco se --- probó dicho rango de concentración.

B. FACTORES CONSTANTES. Se consideraron constantes los siguientes parámetros:

a) Volumen de inyección. El valor asignado a este parámetro -- fué de 10 ul.

b) Relación de concentración de activos. El valor de este --- parámetro, a partir de la concentración de la solución inyectable, fué de 125 partes de Dipirona magnésica y 1 parte de Clorhidrato de Bromhexina.

Esto se justifica dado que no se realizó ninguna modificación en la formulación de la solución inyectable durante la experimentación.

c) Fase estacionaria. Durante todo el desarrollo del método -- analítico no se justificó el cambio de la fase estacionaria, por lo que la fase estacionaria utilizada fué sílica unida covalentemente con octadecil-silane (Watters Ass., μ -Bondapack C₁₈) .

Cabe aclarar que durante el desarrollo se manejaron dos columnas del mismo tipo, con diferente tiempo de uso. Por lo que se evaluó el No. de platos teóricos de cada una de las columnas.

d) Filtro de luz U.V.. El filtro de luz U.V. del detector que se utilizó en la experimentación fué de 254 nm. Debido, primordialmente, -- a que se conocían las longitudes de onda de máxima absorción para ----- Clorhidrato de Bromhexina (290 nm) y Dipirona Magnésica (257 nm) .

Por otro lado, una vez establecidas las condiciones cromatográficas para determinar Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica, se -- evaluó la precisión y la exactitud de resultados analíticos bajo estas --- condiciones utilizando sustancias estándar como referencia. En el caso de no encontrar valores precisos y exactos se ajustaron aquellos parámetros -- que mejoren tales resultados, dichos parámetros pueden ser: Velocidad de -- flujo, concentración de la muestra, pH de la fase móvil, por citar algunos.

3.3.3. Validación del método analítico.

Para establecer la validez de un método analítico fué necesario evaluar dos aspectos: La validez del sistema de medición y la validez del método analítico para las muestras.

La validez del sistema de medición se demostró al evaluar la - precisión y exactitud del sistema cromatográfico aplicado a soluciones que contenían sustancias estándar de fármaco.

La validez del método analítico se demostró al evaluar la precisión, exactitud y especificidad del sistema cromatográfico aplicado en - muestras reales de producción.

Para la evaluación de estos dos aspectos se realizaron los -- siguientes experimentos:

a) Exactitud del sistema. Se trabajaron con soluciones que -- contenían sustancia de referencia, de acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas. Los niveles de concentración que se analizaron fueron - las siguientes: 50, 75, 100, 125 y 150 % de la cantidad nominal de trabajo, es decir, 0.064 mg/ml de sustancia de referencia estándar.

Se tomó como criterio de aceptación el valor de coeficiente de correlación igual a 1.0 y la ordenada al origen igual a cero.

b) Precisión del sistema. De acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas, se efectuaron seis inyecciones de la solución que - contenía sustancia de referencia al 100 % de la concentración nominal de - trabajo (0.064 mg/ml) .

Se tomó como criterio de aceptación un valor de coeficiente de variación menor del 2 %.

c) Exactitud del método. La exactitud del método se evaluó con dos experimentos, el primero establece la influencia del tamaño de la muestra (denominado linealidad de la muestra) y el segundo determina la relación excipiente-fármaco (denominado efecto placebo). Los experimentos ---- realizados para dicha evaluación fueron los siguientes:

Linealidad de la muestra. Se analizaron muestras que contenían solución inyectable conforme al sistema cromatográfico establecido. Los -- niveles de concentración que se trabajaron fueron: 50, 75, 100, 125 y 150 % de la concentración nominal de trabajo (0.064 mg/ml del fármaco en la -- solución inyectable) .

Se tomó como criterio de aceptación una pendiente igual a 1, - ordenada al origen igual a 0 y coeficiente de correlación igual a 1.

Efecto placebo. Se trabajaron seis muestras que contenían sustancia de referencia y solución placebo de la solución inyectable. La ---- sustancia estándar se adicionó a niveles de concentración de 80 y 120 % de la cantidad nominal de trabajo, es decir, concentraciones de 0.051 mg/ml - (80 %) y de 0.076 mg/ml (120 %) de la sustancia estándar.

Se estableció como criterio de aceptación el por ciento promedio de recuperación igual a un 100 % y el coeficiente de variación de las mues- tras menor al 2 % .

d) Precisión del método. Se trabajó con seis muestras que contenían solución inyectable con fármaco al 100 % de la concentración nominal (0.064 mg/ml) . Además, el análisis se realizó en dos días diferentes.

El promedio del por ciento de recuperación igual en todos los - casos y el coeficiente de variación menor al 2 % sirvieron para aceptar -- que el método era preciso.

e) Especificidad en estabilidad. Se analizaron muestras -----
conteniendo solución inyectable y placebo de la solución inyectable, ambas
sometidas con anterioridad a una degradación acelerada a temperaturas de
80° , 60 ° y 40° .C, en lapsos de tiempo de 7, 14 y 21 días.

La ausencia de interferencia en la respuesta del fármaco sirvió
para poder afirmar que el método es específico.

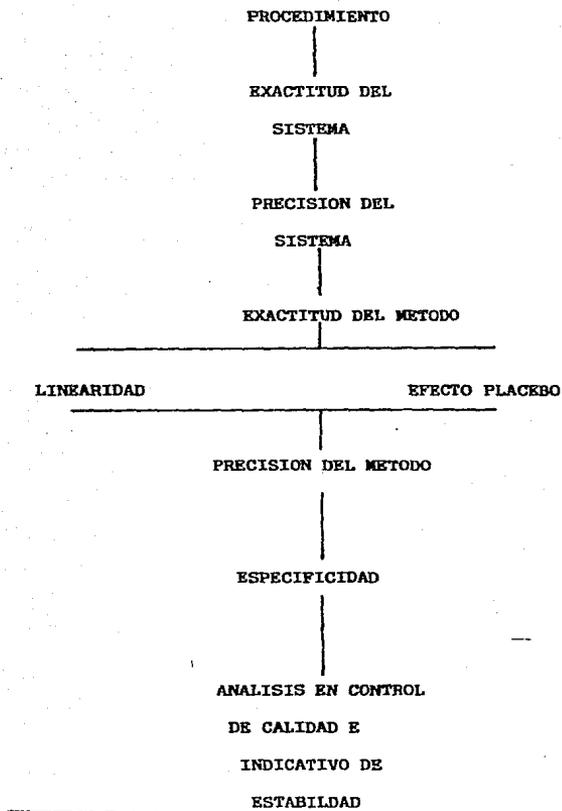


Fig. 3.3. Validación del método analítico.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Desarrollo del método de análisis.

En el transcurso del desarrollo del método de análisis se ---
encontraron los siguientes resultados:

a) Efecto de la polaridad de la fase móvil. A partir de las --
fases móviles propuestas, se encontró que la Dipirona Magnésica presentaba un buen aspecto cromatográfico ante el sistema Metanol/Agua a una propor--
ción 50:50, es decir un tiempo de retención igual a 2.0 min y una resolu--
ción aprox. igual a 1.0; mientras que el caso de Clorhidrato de Bromhexina dicho sistema resulta inadecuado por no presentar un cromatograma definido. Es importante resaltarque estos datos fueron resultado de trabajar con una solución de 0.1 mg/ml de ambos fármacos con una sustancia de referencia.

Por otro lado, cuando se varió la fase móvil, específicamente cuando se adicionó una sal de fosfato de potasio, se observó que el perfil cromatográfico del Clorhidrato de Bromhexina mejoraba notablemente; no así la Dipirona Magnésica que presentó partición en su pico cromatografico. --
Las proporciones que funcionaron mejor fueron las formadas por las mezclas 80:20 y 60:40.

Se decidió seguir trabajando con soluciones acuosas de fosfatos combinadas con Metanol y descartar las mezclas realizadas con Acetonitrilo, ya que estas últimas no presentaron alguna contribución hacia el perfil --
cromatográfico de los fármacos (ver tabla 4.1) y presentaron precipitados cuando se manejaron con solución de fosfato.

Tabla 4.1. Efecto de la polaridad de la fase móvil sobre los tiempos de retención

FASE MOVIL		PROPORCION DE DISOLVENTES (ORGANICO/SOL. ACUOSA)							
		50:50		60:40		70:30		80:20	
	FARMACO	A	B	A	B	A	B	A	B
ORGANICO	ACUOSO								
	AGUA	$t_r=2.0$	(*)	$t_r=1.0$	(*)	NO DETERMINADOS			
METANOL	Solución amortiguadora pH 4.0	(**)	$t_r=7.0$	(**)	$t_r=6.5$	(**)	$t_r=6.5$	(**)	$t_r=6.0$
	AGUA	$t_r=3.0$	(*)			NO DETERMINADOS			
ACETONITRILLO	Solución amortiguadora pH 4.0			SISTEMA INCOMPATIBLE					
	AGUA								

A: Dipirona Magnésica(0.1 mg/ml);B: Clorhidrato de Bromhexina(0.1 mg/ml).

(*):Perfil cromatográfico no definido.

(**): Partición del pico cromatográfico.

.....
12

b) Efecto del pH de la fase móvil. Al variar el pH de la solución amortiguadora se encontró:

1. Un mejor perfil cromatográfico y un menor tiempo de retención del Clorhidrato de Bromhexina, conforme se aumentaba el pH (ver tabla 4.2) .
2. Que a pH 7, contrario a lo que se esperaba, el perfil cromatográfico de Clorhidrato de Bromhexina presentó una forma no simétrica.
3. La partición del pico cromatográfico de la Dipirona Magnésica se presentó en todos los pH's.

De aquí que se encontró que el sistema a elegir para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina fué el sistema formado por Metanol/Solución amortiguadora pH 5.5 a una proporción 80:20 .

c) Efecto de la concentración de sales. Al continuar los ensayos con el sistema de Metanol/Solución amortiguadora (fosfato de potasio - 0.01 M) se observó un desplazamiento de la línea base. Este fenómeno se corrigió con la adición del 1 % de una solución acuosa 0.01 M de Cloruro de Potasio, a la solución amortiguadora. Esto lo maneja Brown (7) como consecuencia del uso de sales de fosfatos comercial, las cuales tienen impurezas no definidas. Este efecto se logra disminuir al aumentar la fuerza iónica de la fase móvil con Cloruro de Potasio (ver figura 4.1.) .

Con la finalidad de mejorar el perfil cromatográfico del Clorhidrato de Bromhexina, fue que se realizó la disminución de la concentración de fosfato monobásico de potasio de un valor de 0.01 M hasta 0.005 M, además no se observó ninguna partición del pico cromatográfico (figura 4.2).

pH	Tiempos de retención(min.)	
	Dipirona Magnésica	Clorhidrato de Bromhexina
3.0	Partición del pico cromatográfico	7.5
4.0	"	7.0
5.5	"	6.0
7.0	"	Señal cromatográfica no simétrica t 10

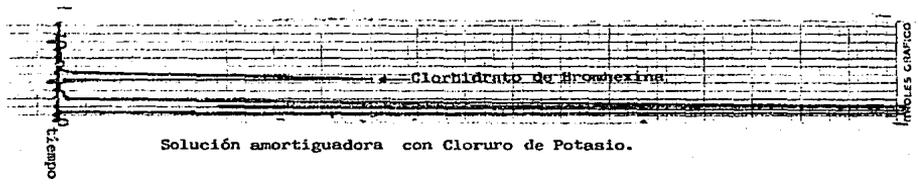
Tabla 3.2.Efecto del pH de la fase móvil sobre el tiempo de retención de Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica.

Por otro lado, en ambos casos se observó la misma partición de la Dipirona Magnésica; tendiendo, en algunos casos, a ser más pronunciada.

d) Efecto de la velocidad de flujo. La influencia de este parámetro, solamente, se ve reflejada sobre los tiempos de retención, si aumentamos la velocidad de flujo se reducen los tiempos de retención de ambos fármacos. Debiendo a esto, se decidió utilizar la velocidad de flujo de 1.5 ml/min dado que se disminuyeron, razonablemente, los tiempos de retención de Clorhidrato de Bromhexina (7.4 min) y Dipirona Magnésica (2.3 min.) .

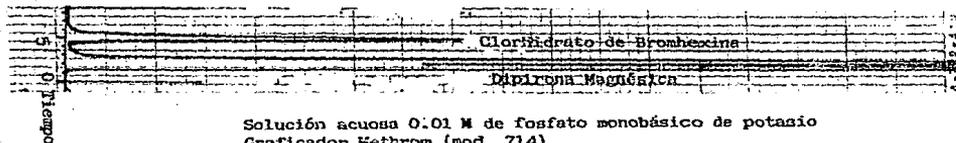


Solución amortiguadora sin Cloruro de Potasio

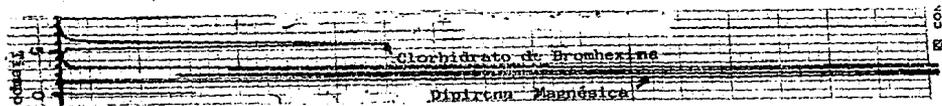


Solución amortiguadora con Cloruro de Potasio.

FIG. 4.1. Cromatogramas de la solución inyectable. Cambio del desplazamiento de la línea base por efecto del aumento de Cloruro de Potasio a la fase móvil.



Solución acuosa 0.01 M de fosfato monobásico de potasio
Graticador Methrom (mod. 714)



Solución acuosa 0.005 M de fosfato monobásico de potasio
Graticador Methrom (mod. 714)

FIG.2.2. Cromatogramas de la solución inyectable.Cambio de
concentración de fosfato monobásico de potasio.

a) Efecto de la sensibilidad del detector y la concentración de la muestra. Para evaluar estos dos factores se decidió combinar sus efectos debido al comportamiento dependiente de la sensibilidad del detector hacia la concentración de la muestra.

Al disminuir la concentración del fármaco, Clorhidrato de --- Bromhexina o Dipirona Magnésica, se aumentaba la sensibilidad, dependiendo de la respuesta del detector y el tamaño del pico cromatográfico. Así se --- llegó a la concentración de trabajo de 0.064 mg/ml con una sensibilidad -- de 0.1 aufs.

FACTORES CONSTANTES.

Como se indicó dentro del desarrollo experimental, se mantuvie--- ron ciertos parámetros en forma constante, de los cuales no se realizó --- ningún cambio durante todo el estudio.

Se señaló que se habían manejado dos columnas del mismo material, pero de diferente edades de uso; el cálculo del No. de platos teóricos --- indicó que la columna más usada tenía 1600, mientras que la menos usada - tenía 3600. Esta diferencia provocó cambios drásticos en las caracteris--- ticas de los cromatogramas de los fármacos. Estos cambios fueron: En la -- columna más usada aumentaron los tiempos de retención, la resolución fue - defectuosa y los picos cromatográficos fueron menos simétricos. Para obten--- er un tiempo de retención, resolución y perfiles cromatográficos semejan--- tes a la columna nueva se aumento y disminuyó la proporción de metanol y solución amortiguadora, respectivamente.

A partir de los anteriores resultados, se podrá observar que:

1. La determinación del clorhidrato de Bromhexina sólo se pudo lograr utilizando la fase móvil Metanol/Solución amortiguadora conteniendo fosfato monobásico de potasio 0.005 M y -- un 1 % de una solución 0.01 M de cloruro de potasio, a una proporción 80:20.
2. Este sistema no pudo ser utilizado para determinar Dipirona Magnésica debido a la partición del pico cromatográfico.

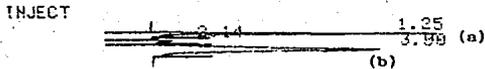
Por lo tanto, se decidió determinar Dipirona Magnésica utilizando la fase móvil constituida por Metanol/Agua (50:50), la cual desde el inicio del estudio brido un buen perfil cromatográfico a dicho fármaco y no así para el Clorhidrato de Bromhexina. Esta decisión fué tomada entre otras razones por la existencia de informes relacionados con la determinación de Dipirona Magnésica por CLAR₍₁₁₎ y la necesidad de analizar las muestras del producto desarrollado y determinar sus características de calidad y estabilidad.

Para establecer parámetros como velocidad de flujo, sensibilidad del detector, concentración de la muestra y aquellos que se asignaron constantes se recurrió a la misma metodología descrita con anterioridad.

Los resultados obtenidos, para la determinación de ambos fármacos, utilizando dos sistemas cromatográficos diferentes figuran en la --- tabla 4.3 . Estos resultados indican las condiciones cromatográficas por las cuales se obtienen una resolución satisfactoria, un buen perfil cromatográfico y, en general, un cromatograma aceptable para determinar Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica (ver figura 4.3) .

PARAMETRO	CLORHIDRATO DE BROMHEXINA	DIPIRONA MAGNESICA
FASE ESTACIONARIA	μ - BONDAPACK C ₁₈	μ - BONDAPACK C ₁₈
FASE MOVIL	Metanol/Sol. acuosa de KH ₂ PO ₄ 0.005 M 1 % KCl 0.01 M	Metanol/Agua
PROPORCION	80:20	50:50
VELOCIDAD DE FLUJO	1.5 ml/min.	1.4 ml/min.
CONCENTRACION DE LA MUESTRA	0.064 mg/ml	0.064 mg/ml
FILTRO U.V.	254 nm	254 nm
SENSIBILIDAD (aufs)	0.1	0.2
VOLUMEN DE INYECCION	10 μ l	10 μ l
T _r aprox.	7.0 - 7.8 min.	1.33 min.
CUANTIFICACION	ESTANDARIZACION EXTERNA	ESTANDARIZACION INTERNA

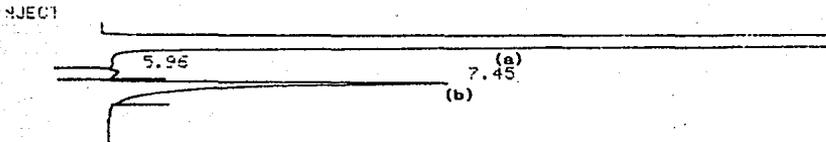
Tabla 4.3. Condiciones cromatográficas finales.



Cuantificación de Dipirona Magnésica

a) Dipirona Magnésica

b) Fenacetina



Cuantificación de Clorhidrato de Bromhexina

a) Dipirona Magnésica

b) Clorhidrato de Bromhexina

Fig. 4.3. Cromatogramas finales.

4.2. Validación del método analítico.

El siguiente paso del trabajo experimental fué validar el --- método analítico desarrollado para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina y Dipirona Magnésica contenidos en una solución inyectable, proveniente de lotes a nivel piloto del área de Desarrollo Farmacéutico.

Por otro lado, para determinar el contenido de cada uno de los fármacos se recurrió a las siguientes relaciones matemáticas:

1. Determinación del contenido de Dipirona Magnésica utilizando un estándar interno.

$$\frac{ABC_{sd}}{ABC_{si}} \times \frac{[S_i]}{[S_d]} = F_r$$

$$\% \text{ activo} = \frac{ABC_{pb}}{ABC_{si}} \times \frac{[S_i]}{F_r} \times \frac{\text{f.d.}}{\text{vol.muestra}} \times 100$$

2. Determinación del contenido de Clorhidrato de Bromhexina utilizando un estándar externo.

$$\% \text{ activo} = \frac{ABC_{pb}}{ABC_{scb}} \times \frac{[S_{cb}]}{\text{vol.muestra}} \times \text{f.d.} \times 100$$

Donde:

ABC_{sd} , ABC_{si} , ABC_{pb} , ABC_{scb} = Area bajo la curva de la solución estándar de Dipirona Magnésica, estándar interno, de la muestra y el estándar de Clorhidrato de Bromhexina.

$[S_i]$, $[S_d]$, $[S_{cb}]$ = Concentración de la solución del estándar interno, estándar de Dipirona Magnésica y Clorhidrato de Bromhexina.

F_r = Factor respuesta; f.d. = factor de dilución.

A. Validación del método analítico para Clorhidrato de Bromhexina.

La validación del método analítico para Clorhidrato de Bromhexina consistió de dos hechos fundamentales, el primero fue la validación del sistema de medición con la evaluación de la exactitud y precisión de la respuesta del sistema; el segundo hecho consistió de la evaluación de la exactitud, precisión y especificidad del método aplicado a muestras reales de producción. Los resultados obtenidos se encuentran desglosados como sigue:

- a. Exactitud del sistema. Para evaluar la exactitud del sistema se determinó la correlación de datos obtenidos del detector y la cantidad correspondiente de Clorhidrato de Bromhexina adicionada. El rango de concentración, a la cual se trabajó, fué de 0.032 a 128 mg/ml (50 -- 200 %).

Los resultados se encuentran en la tabla 4.4, cuyo contenido nos indica que el análisis se realizó por triplicado en cada nivel de concentración. El coeficiente de correlación es igual a 0.9987 y la ordenada al origen es - 249.448 que esta dentro del rango de variación del cero, ambos valores demuestran el comportamiento lineal entre las áreas del pico de Clorhidrato de Bromhexina y la concentración del fármaco. Por lo tanto, podemos hablar que el sistema es exacto dentro de las condiciones establecidas y el rango de concentración experimental.

	Clorhidrato de Bromhe- xina adicionado (mg/ml)	Areas obtenidas
1	0.03218	2744.84
2	0.03218	2760.42
3	0.03218	2795.45
4	0.048	4131.55
5	0.048	4103.90
6	0.048	4226.94
7	0.064	5433.96
8	0.064	5407.38
9	0.064	5653.64
10	0.09654	8430.77
11	0.09654	8519.67
12	0.09654	8598.2
13	0.1287	11706.8
14	0.1287	11645.5
15	0.1287	11403.1

**Coefficiente de
correlación** $r = 0.9987$

**Ordenada al
origen** $b = -249.448$

Pendiente $m = 91408.01$

Tabla 4.4.Exactitud del sistema para Clorhidrato de Bromhexina.

- b. Precisión del sistema. Con la finalidad de determinar la variación de la respuesta del detector, se procedió a evaluar la precisión del sistema.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de seis soluciones conteniendo sustancia estándar de Clorhidrato de Bromhexina, se ---- presentan en la tabla 4.5.. De esta tabla, se reporta la respuesta -- del detector, es decir, el área bajo la curva del pico de Clorhidrato de Bromhexina, con lo cual se obtuvo un valor de coeficiente de variación igual a 2.0063 % . Este valor fue comparado con el teórico de -- aceptación, el cual fue un claro indicio de la precisión del sistema.

Una vez evaluado el sistema de medición, se decidió validar el --- método de análisis mediante los siguientes experimentos:

- c. Exactitud del método. Para determinar la exactitud del método se trabajó con muestras reales de producción fabricadas en condiciones no - analíticas, es decir, solución inyectable fabricada en el área de producción por personas ajenas al químico analista.

Para realizar una evaluación adecuada de la exactitud se estudió - la influencia del tamaño de la muestra y la relación excipiente-fármaco. Los resultados encontrados fueron los siguientes:

Linealidad del método. Se trabajo dentro del rango de concentración de 0.032 a 0.096 mg/ml.

En la evaluación estadística del experimento se encontró un coeficiente de correlación de 0.9992 y una ordenada al origen de -0.001. -- Estos estadígrafos son un claro indicio de la linealidad del método - dentro de las condiciones experimentales establecidas (tabla 4,6) .

Además, con apoyo de un contraste de hipótesis se demostró la ---- exactitud del método dentro del aspecto linealidad del método.

INYECCION	Areas obtenidas
1	5433.96
2	5407.38
3	5653.64
4	5611.64
5	5619.97
6	5650.09

$$\bar{x} = 5562.78$$

$$s = 111.606$$

$$c.v. = 2.0063 \%$$

$$e.r. = 45.563$$

Tabla 4.5. Precisión del sistema para Clorhidrato de Bromhexina.

MUESTRA	CANTIDAD (mg/ml)		% RECUPERACION
	AGREGADA	RECUPERADA	
1	0.032	0.031	96.91
2	0.032	0.03113	97.30
3	0.032	0.03149	98.41
4	0.048	0.04829	100.604
5	0.048	0.04832	100.66
6	0.048	0.04865	101.346
7	0.064	0.06423	100.36
8	0.064	0.06443	100.66
9	0.064	0.06313	98.63
10	0.08	0.07881	98.513
11	0.08	0.07942	99.28
12	0.08	0.07919	99.6
13	0.096	0.09776	101.82
14	0.096	0.09823	102.33
15	0.096	0.09509	99.061

$$r = 0.9992$$

$$b = - 0.001$$

$$m = 1.0147$$

$$\bar{x} = 99.698 \%$$

$$s = 1.594 \%$$

$$c.v. = 1.598 \%$$

$$e.r. = 0.4115 \%$$

Tabla 4.8. Exactitud del método .Linearidad del método de análisis de Clorhidrato de Bromhexina.

Cálculos para linealidad. Para tal efecto se considera la variable independiente como la cantidad adicionada y la variable dependiente como la cantidad recuperada. Por lo tanto tenemos:

$$\begin{aligned}\sum X &= 0.96 & \sum Y &= 0.9592 \\ \sum X^2 &= 0.06912 & \sum Y^2 &= 0.06925 \\ \sum \bar{X} &= 0.064 & \sum \bar{Y} &= 0.06394 \\ S_x &= 0.0234 & S_y &= 0.02378 \\ \sum XY &= 0.06918 & t_{0.975} &= 2.1604 \\ n &= 15\end{aligned}$$

1. Ordenada al origen (b):

$$b = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$b = \frac{(0.9592)(0.06912) - (0.96)(0.06918)}{15(0.06912) - (0.96)^2} = -0.000997$$

2. Pendiente (m):

$$m = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$m = \frac{15(0.06918) - (0.96)(0.9592)}{15(0.06912) - (0.96)^2} = 1.0147$$

3. Error típico de estimación:

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2} \cdot S_{y/x}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - b(\sum Y) - m(\sum XY)}{n}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(0.06925) - (-0.000997)(0.9592) - (1.0147)(0.06918)}{n}}$$

$$S_{y/x} = 0.0007825$$

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} \times 0.0007825 = 0.0008405$$

4. Inferencia acerca de b :

a. Hipótesis contrastada:

$$H_0 : b = b_0$$

$$H_1 : b \neq b_0 \quad \text{donde } b_0 = 0$$

b. Nivel de significancia : $\alpha = 0.05$

$$c. \text{ Estadígrafo de contraste: } t_{b_0} = \frac{b - b_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{(\sum X^2)}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

d. Región crítica bilateral a nivel de significancia α :

$$t_{b_0} \leq t_{\alpha/2}, (n-2) \quad \text{y} \quad t_{b_0} \geq t_{1-\alpha/2}, (n-2)$$

$$t_{b_0} = \frac{-0.000997 - 0}{0.0008405 \sqrt{\frac{0.06912}{15(0.00768)}}} = -1.53$$

Como $2.1604 > -1.53 > -2.1604$, se acepta H_0 . Y por lo tanto es evidencia suficiente para aceptar la ordenada al origen igual a cero.

5. Inferencia acerca de m :

a. Hipótesis contrastada:

$$H_0 : m = m_0$$

$$H_1 : m \neq m_0 \quad \text{donde } m_0 = 1$$

b. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

$$c. \text{ Estadígrafo de contraste: } t_{m_0} = \frac{(m - m_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

d. Región crítica bilateral a nivel de significancia α :

$$t_{m_0} \leq t_{\alpha/2, (n-2)} \quad \text{y} \quad t_{m_0} \geq t_{1-\alpha/2, (n-2)}$$

$$t_{m_0} = \frac{(1.0147 - 1)(0.0234)\sqrt{14}}{0.0008405} = 1.531$$

Como $2.1604 > 1.531 > -2.1604$, se acepta H_0 . Y por lo tanto es evidencia suficiente para aceptar el valor de la pendiente igual a uno.

Efecto placebo. Los resultados para este experimento se describen en la tabla 4.7. A partir de estos resultados (% de recuperación = 99.65 y un coeficiente de variación de 1.41 %) y su respectiva prueba estadística se demuestra que no existe diferencia significativa entre el parámetro poblacional ($\mu = 100\%$) y la media muestral. Por lo tanto no existe efecto de la cantidad de excipientes en cuanto a la exactitud del método.

Cálculos para el efecto placebo. Para realizarlos se considera el porcentaje de recuperación de dicho experimento. Por lo tanto tenemos que:

$$\bar{x} = 99.65\%$$

$$S = 1.405\%$$

$$S/\sqrt{n} = 0.2868\%$$

$$n = 25$$

$$t_{0.975} = 2.0687$$

1. Hipótesis contrastada.

$$H_0 : \mu = \mu_0$$

$$H_1 : \mu \neq \mu_0 \quad \text{donde } \mu = 100\%$$

2. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

3. Estadígrafo de contraste:
$$t = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

4. Región crítica bilateral a nivel de significancia α :

$$t_{\text{calc}} < t_{\alpha/2}, (n-1) \quad \text{y} \quad t_{\text{calc}} > t_{1-\alpha/2}, (n-1)$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{99.65 - 100}{0.2868} = -1.22$$

Como $2.0687 > -1.22 > -2.0687$, se acepta H_0 . Por lo tanto queda demostrado que no existe efecto de la cantidad de excipientes sobre la exactitud del método.

MUESTRA	CANTIDAD RECUPERADA (mg/ml)	% DE RECOBRO
Cantidad adicionada de estándar 0.0513 mg/ml.		
1	0.05206	101.49
2	0.05044	98.34
3	0.05239	102.14
4	0.05164	100.66
5	0.05151	100.41
6	0.05255	102.45
7	0.05123	99.86
8	0.04966	96.8
9	0.0505	98.51
10	0.05029	98.05
11	0.0501	97.72
12	0.0505	98.51

Cantidad adicionada de estándar 0.0769 mg/ml.

1	0.077	100.23
2	0.07742	100.68
3	0.07633	99.26
4	0.07632	99.24
5	0.07638	99.33
6	0.07637	99.314
7	0.0756	98.26
8	0.07603	98.87
9	0.07711	100.27
10	0.07738	100.63
11	0.0766	99.64
12	0.0777	101.0

\bar{x} = 99.65 %

s = 1.405 %

c.v.= 1.41 %

e.r.= 0.2868 %

Tabla 4.7.Efecto placebo en la cuantificación de Clorhidrato
de Bromhexina.

d. Precisión del método. Repetibilidad. El análisis de la precisión del método cuantitativo de Clorhidrato de Bromhexina fue desarrollado por un analista en diferentes días con la misma muestra, mismo instrumento y con los mismos reactivos. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 4.8. Como se observa el coeficiente de variación está por debajo del 2.0 % (1.50 %), en cuyo caso nos demuestra la precisión de los resultados analíticos.

Por otro lado, se realizó un contraste de hipótesis para dejar de manifiesto la variabilidad del método con respecto a la repetición del método de análisis. Dicho contraste rindió como resultado que el método es repetible bajo las condiciones experimentales consideradas.

Cálculos para conocer la repetibilidad del método. Para tal efecto se considero los datos de porcentaje de recuperación de ambos días. Por lo que tenemos que:

$$s = 1.5021$$

$$\sigma_0 = 2.0$$

$$s^2 = 2.2563$$

$$n = 24$$

$$\chi^2_{0.975} = 38.076 \quad N \text{ (grados de libertad)} = 23$$

1. Hipótesis contrastada.

$$H_0 : \sigma^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1 : \sigma^2 \neq \sigma_0^2 \quad \text{donde } \sigma_0^2 = 4$$

2. Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

3. Estadígrafo de contraste:

$$\chi^2 = \frac{(n-1) (s^2)}{\sigma_0^2}$$

4. Región crítica unilateral superior a nivel de significancia α :

$$\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{1-\alpha/2}$$

$$\chi^2_{\text{calc}} = \frac{(23)(2.2563)}{(4)} = 12.974$$

Como $12.974 < 38.076$, se acepta H_0 , con lo que se tiene la evidencia suficiente para apoyar que el método es repetible.

e. Especificidad del método. Este experimento se realizó con lotes piloto de solución inyectable y placebo de Clorhidrato de Bromhexina que contenían Dipirona Magnésica, los cuales se sometieron a degradación acelerada mediante un aumento de la temperatura.

Las muestras fueron analizadas utilizando el sistema analítico propuesto y los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 4.4. Los cromatogramas a, b y c muestran la diferencia entre el estándar de Clorhidrato de Bromhexina, su placebo y la solución inyectable después del almacenamiento a 81 °C.

Las figuras c, d y e son cromatogramas de la solución inyectable a temperatura ambiente, 41° y 81 °C almacenadas durante 21 días, como se observa existe un pico adicional de degradación a 5.0 min. que no produce interferencia alguna.

Por lo tanto no existe ninguna interferencia en la señal correspondiente al Clorhidrato de Bromhexina y bajo estas condiciones el método es ESPECIFICO.

MUESTRA	CANTIDAD RECUPERADA	% DE RECOBRO
1er. Día.		
1	0.06322	98.78
2	0.06302	98.47
3	0.06395	99.92
4	0.06443	100.68
5	0.06517	101.83
6	0.06501	101.58
7	0.06285	98.19
8	0.06373	99.55
9	0.06425	100.39
10	0.06299	98.43
11	0.06376	99.62
12	0.06586	102.92

2o. Día.

1	0.06472	101.25
2	0.06478	101.22
3	0.06577	102.78
4	0.0645	100.78
5	0.0625	97.73
6	0.06294	98.34
7	0.0639	99.85
8	0.0649	101.46
9	0.06388	99.81
10	0.06376	99.63
11	0.0655	102.41
12	0.06478	101.23

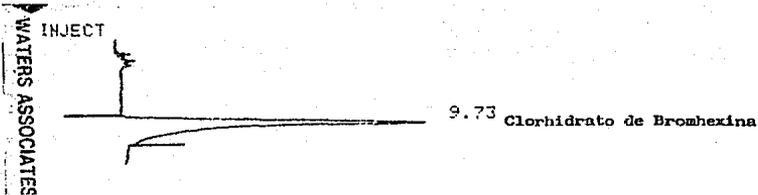
$$x = 100.28 \%$$

$$s = 1.5021 \%$$

$$c.v. = 1.50 \%$$

$$e.r. = 0.306 \%$$

Tabla 4.8. Precisión del método para Clorhidrato de Bromhexina.



a) Solución estándar de Clorhidrato de Bromhexina.
81° C, 21 días.

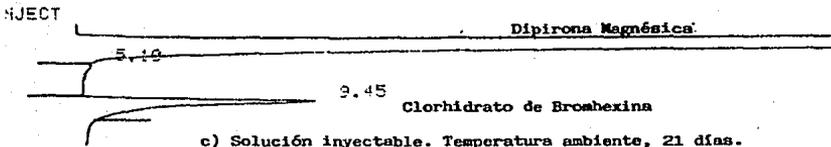
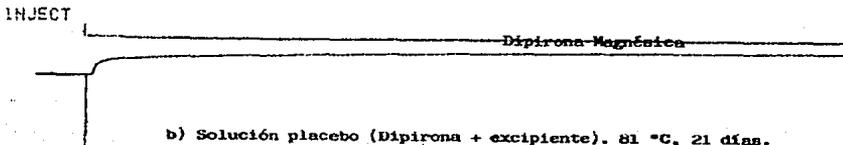


Fig. 4.4. Cromatogramas de Clorhidrato de Bromhexina.
Especificidad del método.

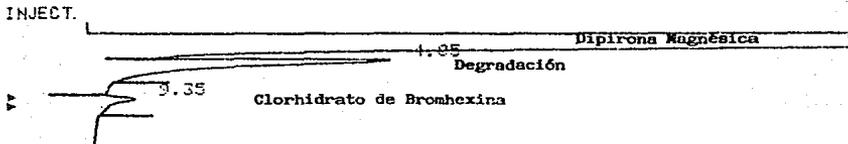
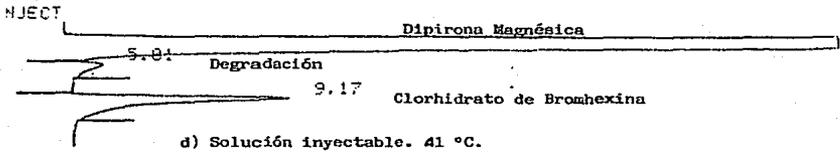


Fig. 4.4. (Cont.). Cromatogramas de Clorhidrato de Bromhexina.
Especificidad del método.

B. Validación del método analítico para Dipirona Magnésica.

La validación del método analítico para Dipirona Magnésica --- consistió, como en el caso del Clorhidrato de Bromhexina, de dos eventos - principales, el primero fue la validación del sistema de medición mediante la evaluación de la exactitud y precisión de la respuesta del sistema; el segundo evento consistió de la determinación de la exactitud, precisión y especificidad del método aplicado a muestras reales de producción.

En ambos casos, la calibración del sistema se realizó mediante el uso de un estándar interno, utilizando una solución al 0.1 mg/ml de -- Fenacetina . Los resultados de dichas evaluaciones son presentados a ---- continuación:

a. Exactitud del sistema. Para evaluar la exactitud del sistema se trabajó dentro de un rango de concentración de 0.032 a 0.096 mg/ml de un están dar de Dipirona Magnésica. Se reportaron las áreas correspondientes -- tanto de Dipirona Magnésica como de Fenacetina, cuyo cociente sirvió - para relacionarlo directamente con la respectiva concentración adicio- nada de estándar (ver tabla 4.9) .

En tal relación se encontró que la correlación de ambos datos ---- corresponden a 1 (0.9995) y su ordenada al origen igual a cero ----- (- 0.00792), que nos comprueba que el sistema debe ser considerado --- exacto dentro de estas condiciones.

MUESTRA	DIPIRONA MAGNESICA ADICIONADA(mg/ml)	RELACION DE AREAS <u>DIPIRONA MAGNESICA</u> <u>FENACETINA(st.interno)</u>
1	0.032	0.2329
2	0.032	0.2363
3	0.032	0.2338
4	0.048	0.3557
5	0.048	0.3532
6	0.048	0.3523
7	0.064	0.4757
8	0.064	0.4819
9	0.064	0.4827
10	0.08	0.5928
11	0.08	0.596
12	0.08	0.6042
13	0.096	0.7191
14	0.096	0.7143
15	0.096	0.7215

Coefficiente de

correlación $r = 0.9995$

Ordenada al origen $b = -0.00792$

pendiente $m = 7.574$

Tabla 4.9. Exactitud del sistema de medición para Dipirona Magnésica.

- b. Precisión del sistema. Con objeto de determinar la variación de la respuesta del detector, se procedió a evaluar la precisión del sistema.

Los resultados obtenidos del análisis de las soluciones estándar de Dipirona Magnésica se reportan en la tabla 4.10. En esta tabla se incluye la relación de áreas entre el estándar de Dipirona Magnésica y Fenacetina (st. interno) y su variación estadística.

Al obtener un valor de coeficiente de variación de 1.86 % ---- menor a 2 %) se comprueba la precisión del sistema para Dipirona Magnésica.

Por otro lado, una vez realizada la validación del sistema de medición, se prosiguió con la validación del método de acuerdo a los siguientes experimentos:

- c. Exactitud del método. La determinación de la exactitud del ---- método fue realizada en muestras de producción, fabricadas en -- condiciones no analíticas, es decir, soluciones fabricadas en el área de producción por personas ajenas al químico analista.

Para efectuar dicha determinación se estudiaron dos factores -- que tienen influencia sobre la exactitud del método, por un lado se determinó la influencia del tamaño de la muestra, denominada -- linealidad; y por otro lado, se estudió la influencia de la canti- dad de excipiente presente en la muestra, conocido como efecto --- placebo.

MUESTRA	RELACION DE AREAS DIPIRONA MAGNESICA <u>FENACETINA (st. interno)</u>
1	0.4757
2	0.4819
3	0.4827
4	0.4832
5	0.4712
6	0.4605

$$\bar{x} = 0.4758$$

$$s = 0.0088$$

$$c.v. = 1.867 \%$$

$$e.r. = 0.0036$$

Tabla 4.10. Precisión del sistema para Dipirona Magnésica.

Linealidad del método. Se trabajo dentro del rango de concentración de 0.032 a 0.096 mg/ml.

En la evaluación estadística del experimento se encontró un --- coeficiente de correlación de 0.9996 y una ordenada al origen de 0.000495. Estos estadígrafos son un claro indicio de la lineari--- dad del método dentro de las condiciones experimentales estable--- cidas (tabla 4.11) .

Además, con apoyo de un contraste de hipótesis se demostró la - exactitud del método dentro del aspecto linealidad del método.

Cálculos para linealidad. Para tal efecto se consideró la ---- variable independiente como la cantidad adicionada y la variable depen---- diente como la cantidad recuperada. Por lo tanto tenemos:

$$\begin{aligned} \sum X &= 0.96 & \sum Y &= 0.9617 \\ \sum X^2 &= 0.06912 & \sum Y^2 &= 0.06925 \\ \bar{X} &= 0.064 & \bar{Y} &= 0.06411 \\ S_x &= 0.0234 & S_y &= 0.0233 \\ \sum XY &= 0.06918 & t_{0.975} &= 2.1604 \\ n &= 15 \end{aligned}$$

1. Ordenada al origen (b):

$$b = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$b = \frac{(0.9617)(0.06912) - (0.96)(0.06918)}{15(0.06912) - (0.96)^2} = 0.00052$$

MUESTRA	CANTIDAD (mg/ml)		% RECUPERACION
	AGREGADA	RECUPERADA	
1	0.032	0.0321	100.312
2	0.032	0.0321	100.312
3	0.032	0.0331	103.43
4	0.048	0.0481	100.21
5	0.048	0.0483	100.625
6	0.048	0.0475	98.96
7	0.064	0.064	100.0
8	0.064	0.0638	99.69
9	0.064	0.0649	101.406
10	0.08	0.0803	100.37
11	0.08	0.0785	98.125
12	0.08	0.0812	101.5
13	0.096	0.0959	99.89
14	0.096	0.0959	99.89
15	0.096	0.09602	100.02

$$r = 0.9996$$

$$m = 0.99404$$

$$b = 0.000495$$

$$\bar{x} = 100.316 \%$$

$$s = 1.194 \%$$

$$c.v. = 1.19 \%$$

$$e.r. = 0.308 \%$$

Tabla 4.11.Exactitud del método.Linearidad del método de análisis de Dipirona Magnésica.

2. Pendiente (m) :

$$m = \frac{n (\sum XY) - (\sum X) (\sum Y)}{n (\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$m = \frac{15 (0.06918) - (0.96)(0.9617)}{15 (0.06912) - (0.96)^2} = 0.99364$$

3. Error típico de estimación:

$$\widehat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2} \times S_{y/x}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - b (\sum Y) - m (\sum XY)}{n}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(0.06925) - (0.00052)(0.9617) - (0.9936)(0.06918)}{15}} = 0.000812$$

$$\widehat{S}_{y/x} = 0.000812 \times \sqrt{\frac{15}{13}} = 0.0008722$$

4. Inferencia acerca de b :

a. Hipótesis contrastada:

$$H_0 : b = b_0$$

$$H_1 : b \neq b_0 \quad \text{donde } b_0 = 0$$

b. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

c. Estadígrafo de contraste:

$$t_{b_0} = \frac{b - b_0}{\widehat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{(\sum X^2)}{n (X_1 - X)^2}}}$$

d. Región crítica bilateral a nivel de significancia α :

$$t_{b_0} \leq t_{\alpha/2}, (n-2) \quad \text{y} \quad t_{b_0} \geq t_{1-\alpha/2}, (n-2)$$

$$t_{b_0} = \frac{(0.00052 - 0)}{0.0008722 \sqrt{\frac{0.06912}{15 (0.00768)}}} = 0.7697$$

Como $2.1604 > 0.7697 > -2.1604$, se acepta H_0 . Y por lo tanto, es evidencia suficiente para aceptar la ordenada al origen igual a cero.

5. Inferencia acerca de m :

a. Hipótesis contrastada:

$$H_0 : m = m_0$$

$$H_1 : m \neq m_0 \quad \text{donde } m_0 = 1$$

b. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

$$c. \text{ Estadígrafo de contraste: } t_{m_0} = \frac{(m - m_0) S_x \sqrt{n-1}}{\widehat{S}_{y/x}}$$

d. Región crítica bilateral a nivel de significancia α :

$$t_{m_0} \leq t_{\alpha/2}, (n-2) \quad \text{y} \quad t_{m_0} \geq t_{1-\alpha/2}, (n-2)$$

$$t_{m_0} = \frac{(0.99404 - 1.0)(0.0234) \sqrt{14}}{0.0008722} = -0.5983$$

Como $2.1604 > -0.5983 > -2.1604$, se acepta H_0 . Y por lo tanto, es evidencia suficiente para aceptar el valor de la pendiente igual a uno.

Efecto placebo. Para la realización de este experimento se --- trabajaron con dos niveles de concentración, 80 % (0.052 mg/ml) y 120 % - (0.0769 mg/ml) de la cantidad nominal de trabajo. Los resultados de este - experimento se encuentran enlistados en la tabla 4.12, cuyos parámetros -- estadísticos indican que no existe diferencia significativa entre el valor teórico de 100 % y los valores experimentales. Comprobando de manera ----

MUESTRA	CANTIDAD RECUPERADA (mg/ml)	% DE RECOBRO
Cantidad adicionada de estándar 0.0513 mg/ml.		
1	0.0508	99.375
2	0.0517	100.99
3	0.0511	99.71
4	0.0516	100.82
5	0.0507	99.04
6	0.0500	97.675
7	0.0523	102.21
8	0.0513	100.13
9	0.0515	100.54
10	0.0511	99.78
11	0.0511	99.76
12	0.0518	101.2
Cantidad adicionada de estándar 0.0768 mg/ml.		
1	0.07519	97.9
2	0.07466	97.21
3	0.07483	97.434
4	0.07607	99.05
5	0.07656	99.68
6	0.07472	97.29
7	0.07624	99.27
8	0.0781	101.69
9	0.07676	99.95
10	0.0771	100.39
11	0.07594	98.88
12	0.0771	100.34

x = 99.59 %

s = 1.372 %

c.v. = 1.38 %

e.r. = 0.280 %

Tabla 4.12. Efecto placebo en la cuantificación de Dipirona Magnésica.

explicita al realizar un contraste de hipótesis. Por lo tanto se concluye que no existe efecto de la cantidad de excipientes en cuanto a la exactitud del método.

Cálculos para el efecto placebo. Para realizarlos se considera el porciento de recuperación de dicho experimento. Por lo tanto tenemos que:

$$\bar{X} = 99.59 \%$$

$$S = 1.372 \%$$

$$s/\sqrt{n} = 0.280 \%$$

$$n = 25$$

$$t_{0.975} = 2.0687$$

1. Hipótesis contrastada.

$$H_0 : \mu = \mu_0$$

$$H_1 : \mu \neq \mu_0 \quad \text{donde } \mu = 100 \%$$

2. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

3. Estadígrafo de contraste:
$$t = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

4. Región crítica bilateral a nivel de significancia α :

$$t_{\text{calc}} < t_{\alpha/2}, (n-1) \quad \text{y} \quad t_{\text{calc}} > t_{1 - \alpha/2}, (n-1)$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{99.59 - 100}{0.280} = -1.464$$

Como $2.0687 > -1.464 > -2.0687$, se acepta H_0 . Por lo tanto queda demostrado que no existe efecto de la cantidad de excipientes sobre la exactitud del método.

d. Precisión del método. Repetibilidad. El análisis de la precisión del método cuantitativo de Dipirona Magnésica fue desarrollado --- por un analista en diferentes días con la misma muestra, mismo --- instrumento y con los mismos reactivos. Los resultados obtenidos --- figuran en la tabla 4.13. Como resultado se encontró un coeficiente de variación menor al 2 % (1.453 %) y al comprobarlo estadísticamente (contraste de hipótesis), se asume que el método es preciso dentro de las condiciones de análisis establecidas.

Cálculos para conocer la repetibilidad del método. Para tal efecto se consideró los datos de porcentaje de recuperación de ambos días. Por tanto tenemos que:

$$s = 1.443 \% \quad \sigma_o = 2.0$$

$$s^2 = 2.0822 \quad n = 24$$

$$\chi^2_{0.975} = 38.076 \quad N \text{ (grados de libertad)} = 23$$

1. Hipótesis contrastada.

$$H_0 : \sigma^2 = \sigma_o^2$$

$$H_1 : \sigma^2 \neq \sigma_o^2 \quad \text{donde } \sigma_o^2 = 4$$

2. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

3. Estadígrafo de contraste:

$$\chi^2 = \frac{(n-1) (s^2)}{\sigma_o^2}$$

3. Región crítica unilateral superior a nivel de significancia α :

$$\chi^2_{\text{calc}} \geq \chi^2_{1-\alpha/2}$$

MUESTRA	CANTIDAD RECUPERADA (mg/ml)	% DE RECOBRO
1er. Día.		
1	0.06453	100.84
2	0.06371	99.55
3	0.06417	100.4
4	0.06417	100.3
5	0.0637	99.53
6	0.0626	97.82
7	0.0645	100.74
8	0.0633	98.84
9	0.0623	97.4
10	0.0619	96.72
11	0.0632	98.75
12	0.06365	99.465
2o. Día.		
1	0.0656	102.5
2	0.0643	100.49
3	0.0644	100.64
4	0.0639	99.9
5	0.0638	99.72
6	0.0646	101.03
7	0.063	98.49
8	0.0629	98.28
9	0.0618	96.71
10	0.0636	99.34
11	0.0629	98.32
12	0.0627	97.97

$\bar{x} = 99.32 \%$

$s = 1.443 \%$

$c.v. = 1.453 \%$

$e.r. = 0.294 \%$

Tabla 4.13. Precisión del método para Dipirona Magnésica.

$$f_{\text{calc}} = \frac{(23) (2.0822)}{(4)} = 11.973$$

Como $11.973 < 38076$, se acepta H_0 , con lo cual se tiene la ---- evidencia suficiente para apoyar que el método es repetible.

e. Especificidad del método. Este experimento se realizó con lotes --- piloto de solución inyectable y placebo de Dipirona Magnésica que - contenían Clorhidrato de Bromhexina, los cuales se sometieron a --- degradación acelerada mediante un aumento de temperatura.

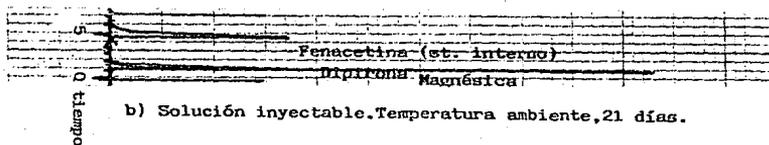
Las muestras fueron analizadas utilizando el sistema analítico -- propuesto y los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 4.5. Los cromatogramas a y b muestran la diferencia entre el estándar de Dipirona Magnésica y la solución inyectable con Fenacetina.

Las figuras b, c y d son cromatogramas de la solución inyectable a temperatura ambiente, 41° y 81° C almacenadas durante 21 días. Existen signos de degradación que se encuentran a un tiempo de ---- retención de 3.0 min., pero no produce interferencia alguna tanto - para Dipirona Magnésica como para Fenacetina.

Por lo tanto, al no haber interferencia sobre la señal de Dipiro na Magnésica y su estándar interno se considera que el método es ESPECIFICO, dentro de las condiciones experimentales aquí menciona das.

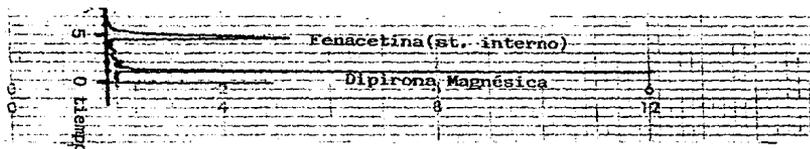


a) Solución estándar de Dipirona Magnésica.
81 °C, 21 días.



b) Solución inyectable. Temperatura ambiente, 21 días.

Fig.4.5. Cromatogramas de Dipirona Magnésica. Especificidad del método.



c) Solución inyectable. 41 °C ,21 días.



d) Solución inyectable. 81 °C ,21 días.

Fig.4.5.(Cont.).Cromatogramas de Dipirona Magnésica.
Especificidad del método.

5.0 CONCLUSIONES

1. La Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se aplicó con éxito al análisis de Dipirona Magnésica, y Clorhidrato de Bromhexina contenidos en una solución inyectable; Sin embargo, se desarrollo un método individual para cada uno de los fármacos debido, entre otras cosas, a sus diferencias químicas y a la relación de concentración que guardan ambos fármacos dentro de la solución inyectable.
2. El pH y la fuerza iónica de la fase móvil afectan favorablemente las características cromatograficas del Clorhidrato de Bromhexina; pero no así a la Dipirona Magnésica que aún cuando se conoce de sus características iónicas, demostró tener un mejor comportamiento cromatográfico con la fase móvil Metanol/ Agua.
3. Se demostró que ambos métodos analíticos son EXACTOS, PRECISOS y ESPECIFICOS dentro de las condiciones aquí establecidas.
4. Se comprobó la aplicabilidad de los métodos analíticos dentro del área de Control de Calidad, fundamentalmente por encontrar, a lo largo del estudio, tiempos reducidos de análisis y su consecuente reducción de costos de análisis.

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar corridas más específicas sobre aquellos productos de degradación (oxidación, hidrólisis o fotodegradación) y aquellas sustancias que pudieran estar incluidas en la materia prima como impurezas.
2. Probar la reproducibilidad del método tanto a nivel analista, instrumental como a nivel interlaboratorio; como parte complementaria a esta tesis.
3. Realizar ensayos en sustancias de estructura similar al Clorhidrato de Bromhexina, con la finalidad de encontrar un estándar interno y realizar una comparación con la estandarización externa desarrollada en este trabajo.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar G.S., Graciela y Fernando Román, "Guidelines for methods validation", Searle International Co., Abril, 1983.
2. Aguilar G.S., Graciela y Virgilio Chavés, "Simposium sobre validación de métodos analíticos", organizada por A.F.M., 24-25 de Mayo de 1984, Cámara Nacional de la Industria Químico-Farmacéutica, -- México, D.F..
3. Aguilar G.S., Graciela y Ramón Rodríguez, "Curso sobre Validación de métodos analíticos", organizado por Colegio Nacional de Q.F.B., México, A.C., 9-10 de Julio de 1986, Cámara Nacional de la Industria Químico-Farmacéutica, México, D.F..
4. Austin, K.L., et al., "Determinación por CLAR de morfina y para-- benos en inyectables". J.Pharm. Sci., 67, 1510-1511, 1978.
5. Boehringer Ingelheim, "Reporte sobre estabilidad Bisolvón-Ampicilina, solución inyectable", 1982.
6. Boehringer Ingelheim Zentrale, "Validación de los métodos analí-- cos para el control de medicamentos", 1985.
7. Brown, R.P., "High pressure liquid chromatography", Academic Press U.S.A., 1973, pp. 90-94.
8. Chapman, K.G., "The PAR approach of process validation", Pharm. - Tech., Diciembre, 22- 36, 1981.
9. Chapman, K.G., et al, "Process validation concepts for drug ----- products", Pharm. Tech., Septiembre, 78-82, 1985.
10. DiPalma, J.R., "Drill/Farmacología medica", Prensa Medica Mexicana México, 1978, pp 1004-1007.

11. Eddine, N.H., et al., "Stability indicating assay for dipyrone. Part II", *Analyst*, 107, 67-70, 1982.
12. Fry, E.M., "Principios generales de validación de procesos", *Pharm. Engin.*, 4, 33-36, 1984.
13. Guerra, J., "Validation of analytical methods by FDA", *Pharm.Tech.*, Marzo, 74-81, 1986.
14. Gupta, D.U., "Determinación simultánea de analgésicos por CLAR", *J. Pharm. Sci.*, 69, 110-113, 1980.
15. Loftus, B.T. y R.A. Nash, "Pharmaceutical Process Validation", -- Marcel Dekker, Inc., U.S.A., 1983, pp 251-266.
16. Massart, L.D., et al., "Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures", Elsevier Scientific Publishing Company, Holanda, 1980, pp 7-21.
17. McNair, H.M., "Equipment for HPLC-V", *J. Chromatogr. Sci.*, 20, 537-550, 1982.
18. McNair, H.M., et al., "Cromatografía de líquidos de alta ----- resolución", O.E.A., U.S.A., 1980.
19. Michaelis, A.F., et al., "High pressure liquid chromatography -- review", *J. Pharm. Sci.*, 62, 1399-1414, 1973.
20. Miyazaki, S., et al., "Precaution on use of hydrochloride salts - in pharmaceutical formulation", *J. Pharm. Sci.*, 70, 594-596, 1981.
21. Ostle, B., "Estadística aplicada", Limusa, México, 1981, pp 131-167.
22. Remington, R.D., M. Anthony Schork, "Estadística Biométrica y --- Sanitaria", Prentice Hall Inter., España, 1974, pp 173-204.

23. Runser, D.J., "Maintainig and Troubleshooting HPLC systems. A --- user's guide", John Wiley & sons, U.S.A., 1981.
24. Schirmer, R.E., "Modern methods of pharmaceutical analysis", ----- C.R.S. Press, U.S.A., 1982, vol III, pp 61-137.
25. Snedecor, G.W. y William G. Cochran, "Métodos estadísticos", --- C.E.C.S.A., México, 1982, pp 123-156.
26. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., "Introduction to modern liquid ---- chromatography", John Wiley and Sons, U.S.A., 1974, pp 16-81.
27. Steel, R.G.D. y James H. Tornie, "Principles and procedures of - statistics. A biometrical approach", Mc Graw Hill, Japón, 1980, pp 86-121.
28. Vanderwielden, A.J., et al., "Guidelines for assay validation", - Pharm. Tech., Marzo, 66-76, 1982.
29. Watters Ass., "Manuales de operación de CLAR", 1983.