



104201
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO DE
ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION (CLAR) PARA CUANTIFICAR
PSEUDOEDEFDRINA SULFATO EN GOTAS
PEDIATRICAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A ;
LAURA SILVIA ONDARZA ROVIRA

FALLA DE ...



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

	Página
1.Introducción	2
2.Generalidades	4
2.1 Monografía	5
2.1.1 Sulfato de pseudoefedrina	5
2.2 Líquidos orales	7
2.3 Material de envase	9
2.3.1 Plástico	10
2.3.2 Vidrio	12
2.4 Cromatografía	14
2.4.1 Cromatografía.Fundamentos	15
2.4.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	24
2.5 Desarrollo de métodos analíticos	37
2.6 Validación de métodos analíticos	40
3.Parte Experimental	42
3.1 Desarrollo del sistema	43
3.2 Validación del método analítico	55
4.Conclusiones	77
5.Bibliografía	79

INTRODUCCION

"¿Tienes una teoría?" "Sí, una provisional.
Pero no me sorprenderé si no es la correcta".

A.C. Doyle

1. INTRODUCCION

Asegurar que la concentración del principio(s) activo(s) contenidos en una forma farmacéutica es la correcta y que ésta se mantiene a lo largo de un tiempo adecuado para su consumo, es un requerimiento necesario para garantizar que el medicamento va a cumplir su fin al ser administrado a los pacientes que lo requieren.

Para poder realizar dicha verificación tanto en el control de calidad rutinario del producto como en el estudio de su estabilidad es necesario contar con métodos analíticos confiables. Dentro de las opciones con que hoy día contamos se encuentran los métodos cromatográficos, los cuales si son correctamente desarrollados y validados nos permiten conocer la concentración del fármaco en los productos que lo contengan.

En el presente trabajo se expone el desarrollo y validación de un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), el cual emplea cromatografía de fase inversa y la formación de pares iónicos para cuantificar pseudoefedrina en solución oral.

En la preparación de la muestra, se utilizaron pre-columnas (SEP-PAK) que dejan a la pseudoefedrina libre de interferencias.

GENERALIDADES

"¿Cuál es el significado de todo esto, Sr Holmes?" "Ah. No tengo datos. No puedo decirlo".

A.C. Doyle

2.1 MONOGRAFIA

2.1.1 SULFATO DE PSEUDOFEDRINA (1-15).

d-Isorefedrina sulfato, (+)2-metilamino-1-fenilpropanol sulfato, Pseudoefedrina sulfato. $C_{10}H_{15}NO \cdot H_2SO_4$. P.M. = 428.55

Polvo blanco cristalino, prácticamente inodoro, de sabor amargo.

Intervalo de fusión: $182^{\circ}C - 184^{\circ}C$.

Rotación específica : $[\alpha]_{20}^D = + 61.0^{\circ}$ hasta 62.5°

Su solución en agua tiene un pH aproximado entre 4.6 y 6.

Espectro de absorción UV :

Pseudoefedrina sulfato en agua, máximo a 250.5 nm ($E1\%, 1cm = 7.5$), 256.5 nm ($E1\%, 1cm = 9.9$) y 262.5 nm ($E1\%, 1cm = 7.9$); mínimos a 227nm, 252.5 nm y 259 nm.

Solubilidad: soluble en aproximadamente 1 parte de agua, fácilmente soluble en etanol, poco soluble en cloroformo, prácticamente insoluble en éter.

Pérdida por secado: como máximo 0.5% (2 hr, $105^{\circ}C$)

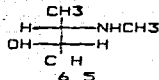
Conservación: en recipientes bien cerrados y al abrigo de la luz.

Vía de administración: oral, parenteral, tópica, nasal.

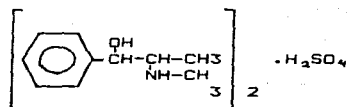
Dosis oral para niños de 4 meses a 6 años: 30 mg, 3 o 4 veces diarias; infantes : 15 mg 3 o 4 veces diarias.

Campos de aplicación: estados de agotamiento, asma bronquial, narcolepsia. Agente adrenérgico empleado en enfermedades alérgicas.

Configuración absoluta: (+)- ψ - efedrina.



Fórmula estructural



Métodos de análisis opcionales descritos en la bibliografía:

- a) Valoración con ácido perclórico
- b) Cromatografía en papel
- c) Cromatografía en capa fina
- d) Cromatografía de gases
- e) CLAR
- f) Espectroscopía UV
- g) Espectroscopía infrarrojo
- h) Resonancia magnética nuclear.

2.2 LIQUIDOS ORALES (8,16,17)

Son formas farmaceuticas que se administran por via oral y son más fáciles de absorber que los medicamentos solidos.

Los líquidos orales son soluciones generalmente acuosas, de uno o más fármacos con o sin saborizantes, aromatizantes o agentes colorantes.

Pueden ser formuladas para administración oral directa al paciente o ser proporcionadas en una forma más concentrada que debe ser diluida antes de su administración oral. También pueden proporcionarse como sólidos solubles o mezclas de sólidos solubles, para ser disueltos en agua u otros líquidos, antes de su administración oral.

En la formulación deben de incluirse agentes antimicrobianos para proteger a la preparación de contaminación por bacterias, hongos y levaduras.

Las sustancias adicionadas a las fórmulas farmacéuticas líquidas, deben ser inocuas en las cantidades administradas, no deben de interferir con la eficacia terapéutica, ni causar toxicidad, ni entorpecer las pruebas y ensayos prescritos.

En su formulación intervienen comunmente:

- Principio activo o base medicamentosa.
- Vehículo y co-solventes: agua destilada, sorbitol 70%, alcohol, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol 400.

- Edulcorante: sacarosa, ciclamato sódico, sacarina sódica, aspartame.
- Correctivo de sabor: ácido cítrico, aceites esenciales, zumos.
- Conservador: metilparazeno, ácido benzoico y sus sales, propilparabeno, ácido sórbico y sus sales.
- Regulador de pH: fosfato de sodio anhidro, ácido cítrico, citrato de sodio.
- Saborizantes

Las propiedades fisicoquímicas del principio activo y sus características organolépticas condicionarán la naturaleza del vehículo a emplear y la calidad y cantidad de los otros aditivos de la fórmula.

2.3 MATERIAL DE ENVASE (17-19)

Es indispensable realizar estudios que nos permitan conocer el grado de interaccion que pudiera existir entre el contenedor y el producto a fin de poder asegurar la estabilidad del mismo en el mercado.

En base a estos estudios se han llegado a establecer las características que debe de cumplir un determinado tipo de envase para conservar las propiedades iniciales del producto y dar así seguridad al paciente.

El primer requerimiento para cualquier envase es que proporcione un adecuado nivel de protección en favor del contenido, preservándole de los factores adversos del medio que lo rodea. Debe determinarse el tiempo durante el cual se ejerce tal protección y las consecuencias de una falla de la misma. Además, el envase no debe de impartir al producto ni sabor ni olor, no ser reactivo con el producto, no ser tóxico, ser adaptable al acondicionamiento rápido, ser manejable de manera sencilla y segura, y ser fácil de conseguir.

Los materiales en los que se acondicionó a la solución oral en el presente proyecto, fueron el polietileno de alta densidad y el vidrio tipo III, por lo que a continuación se describirán las propiedades de estos materiales en particular.

2.3.1 MATERIALES PLASTICOS

Los materiales plásticos son productos orgánicos de alto peso molecular que por su plasticidad pueden ser moldeables. Se preparan partiendo de compuestos simples que por reacciones de condensación y polimerización forman largas cadenas que dan por resultado productos de alto peso molecular.

Junto con el material plástico se encuentran estabilizantes, lubricantes, plastificantes y colorantes.

Por ello, cuando se emplea el plástico para confeccionar envases de uso farmacéutico, es importante conocer la naturaleza de tales aditivos, pues ellos pueden emigrar hacia el producto envasado y modificar el olor, color, conferir toxicidad y provocar reacciones no deseadas. Por ejemplo, el cloruro de polivinilo tiene tendencia a descomponerse y liberar ácido clorhídrico. Esta reacción se acelera con la temperatura, con la luz y en presencia de pequeñas cantidades de algunos metales.

Las ventajas de los materiales plásticos es que son livianos, sólidos, de cómodo almacenaje y transporte, desechables, fáciles de manejar y económicos.

Ensayos de Control de los envases y su contenido.

a. Aspecto, caracteres organolépticos, identificación.

- b. pH
- c. Residuo seco
- d. Permeabilidad
- e. Ensayos químicos
 - .Amoniaco .Agentes reductores .Metales pesados
- f. Toxicidad, pirogenicidad y pruebas biológicas.
- g. Aditivos

Los envases plásticos más comunmente usados por la industria farmacéutica son el polietileno de alta y baja densidad, el polipropileno, el poliestireno, el polietilen tereftalato y el cloruro de polivinilo.

El polietileno es esencialmente una larga cadena compuesta de cientos, y a veces de miles de átomos de carbono con relativa - mente pocas ramificaciones.

Tiene un bajo costo, y su moderada flexibilidad es usada para moldear los frascos. Es firme, es translúcido en su estado natural y puede adquirir colores opacos. Es inodoro e insípido.

Es una buena barrera para la humedad pero relativamente pobre para el oxígeno y otros gases. Puede quebrarse en presencia de algunos productos tales como detergentes. a menos de que esté formulado con resinas.

Muchos disolventes no atacan al polietileno, y no es afectado por ácidos fuertes y álcalis, con excepción del ácido nítrico con-

centrado caliente. Los olores y sabores se ven afectados a menudo ya que transpiran rápidamente. La superficie del polietileno es no polar y debe de ser tratada a la flama antes de ser impresa.

2.3.2 EL VIDRIO

El vidrio es un producto inorgánico de fusión que es enfriado a una condición rígida sin cristalización.

El vidrio no es un especie química definida. Sus componentes pueden variar enormemente y las propiedades dependerán de su composición química y de las condiciones de elaboración del mismo.

La estructura interna del vidrio se explica como un retículo vítreo, formado por la unión del oxígeno con otros elementos más o menos variables que son :

- Elementos formadores del retículo, los cuales se unen al oxígeno para formar las mallas del retículo como el silicio, boro, fósforo, arsénico, vanadio y germanio.
- Deformadores del retículo, elementos que se incrustan en el interior de las mallas, modificando las propiedades del retículo como el sodio, potasio, litio, calcio y bario.
- Iones que funcionan como formadores o deformadores como el aluminio, hierro, manganeso, plomo y titanio.

Entre sus ventajas se encuentra el hecho de que no se deteriora con el tiempo, pero su desventaja es su fragilidad y peso.

Ensayos de Control

- a. Dimensiones.
- b. Resistencia a la presión interna.
- c. Resistencia térmica.
- d. Alcalinidad.

Clasificación de los vidrios usados en Farmacia:

- a. Vidrio tipo I - de borosilicatos.
- b. Vidrio tipo II - de composición sódico - cálcica que ha sufrido un proceso de neutralización con anhídrido sulfuroso.
- c. Vidrio tipo III - sódico cálcico sin tratamiento superficial
- d. Vidrio tipo IV - sódico - cálcico de uso general que no se emplea en soluciones inyectables.

El vidrio empleado en el acondicionamiento de la solución oral analizada en el presente proyecto fue el Vidrio tipo III.

Composición del vidrio tipo III

SiO_2 71% , Al_2O_3 2% , $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}$ 13% , BaO_3 - MgO 14%.

Este tipo de vidrio se ha usado para envasar antibióticos en polvo, liofilizados, soluciones oleosas y medicamentos de uso oral.

2.4 CROMATOGRAFIA (20-27)

En la actualidad los métodos cromatográficos han ido adquiriendo mayor relevancia como métodos de análisis debido a las ventajas que presentan frente a otros métodos analíticos ya existentes.

Los métodos analíticos tales como la espectrofotometría UV, visible e IR, resonancia magnética nuclear, etc. requieren que la sustancia a analizar se encuentre en un estado muy puro, lo cual en muchas ocasiones involucra una preparación de la muestra complicada y costosa.

Los métodos cromatográficos se presentan como una solución para reducir el tiempo de análisis, manipuleo y costo de preparación de la muestra.

Dichos métodos van dirigidos fundamentalmente a la separación de dos o más sustancias. La pureza del compuesto a analizar se demuestra únicamente si se comprueba la ausencia de posibles impurezas.

Las separaciones cromatográficas se emplean en la obtención de compuestos puros y en el análisis cualicuantitativo de uno o más de los compuestos presentes en una mezcla; el que un método sea adecuado depende de cual de las dos aplicaciones anteriores se persiga.

La cromatografía proporciona una gama extraordinariamente variada de métodos fisicoquímicos posibles para la purificación y el análisis de compuestos de interés.

2.4.1 CROMATOGRAFIA.FUNDAMENTOS.(21-22)

La cromatografía abarca un grupo variado e importante de métodos que permiten separar, aislar, identificar y cuantificar componentes estrechamente relacionados presentes en mezclas complejas.

En estos métodos se emplea una fase estacionaria y una fase móvil que fluye sobre la anterior.

La fase estacionaria es un sólido o un líquido colocado sobre un soporte sólido; las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los componentes de la muestra.

La fase móvil que se hace pasar a través de la fase estacionaria se denomina eluyente o acarreador, el cual puede ser un líquido o un gas.

Los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil o volátiles en el caso de cromatografía de gases; deben ser capaces de interaccionar con la fase estacionaria ya sea disolviéndose, o adsorbiéndose en ella.

Si se coloca al final de la columna (en la cromatografía de elución) un detector que responda a los solutos y se representa gráficamente su señal como una función del tiempo (o del volumen de la fase móvil), se obtiene una serie de picos cuya área bajo la curva es proporcional a la concentración del soluto. A esta representación gráfica se llama cromatograma.

Clasificación de las separaciones cromatográficas

TABLA No.1

Nombre	Fase móvil	Fase estacionaria
Gas - líquido	Gas	Líquido
Gas - sólido	Gas	Sólido
Partición	Líquido	Líquido
Adsorción	Líquido	Sólido
Gel	Líquido	Líquido
Intercambio iónico	Líquido	Sólido

Todos los procedimientos cromatográficos, se basan en las diferencias en el grado con el cual los solutos sufren partición entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los equilibrios relacionados pueden describirse en forma cuantitativa por medio de una constante dependiente de la temperatura, el coeficiente de partición K :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

donde:

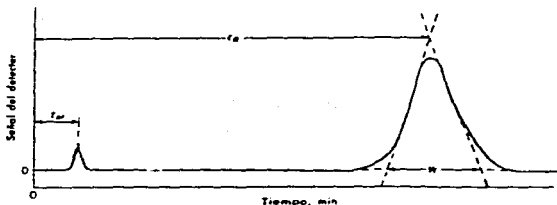
C_s = concentración analítica total de un producto en la fase estacionaria y

C_m = concentración de dicho soluto en la fase móvil.

En el caso ideal, la razón de partición es constante en una amplia gama de concentraciones de soluto; es decir, C_s es directamente proporcional a C_m . La cromatografía que se lleva a cabo bajo condiciones tales que K es constante, se denomina cromatografía lineal.

Términos involucrados en esta teoría:

- Volumen de elución. V_e . Es el volumen de eluyente que se necesita para eluir una sustancia de una columna cromatográfica a su concentración máxima.
- Tiempo de retención. t_r . Es el tiempo que se necesita para eluir una sustancia a su concentración máxima.



- t_m es el tiempo necesario para que una molécula de la fase móvil pase a lo largo de la columna.

La teoría original de la cromatografía, llamada teoría de los platos teóricos, fue capaz de describir las velocidades de la migración en forma cuantitativa. Sin embargo, su utilidad es limitada porque no describe los efectos de las variables que ocasionan el ensanchamiento del área bajo la curva. Por lo que se sustituyó por la teoría cinética.

La teoría de los platos considera que una columna está compuesta por una serie de estrechas capas horizontales y contiguas separadas, denominadas platos teóricos; en cada plato tiene lugar el equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. La eficacia de una columna como dispositivo de separación mejora al incrementar el número de equilibrios. Así, el número de platos teóricos N , se utiliza como una medida de la eficiencia de la columna.

$$N = \frac{L}{H}$$

dónde:

H = altura equivalente de un plato teórico

L = longitud del empaque de la columna

Teoría cinética

La observación de un cromatograma pone de manifiesto su semejanza con las curvas gaussianas o de distribución normal que se obtienen cuando se grafican valores repetidos de una medida en función de la frecuencia de su aparición. De manera semejante, la forma gaussiana de un cromatograma puede atribuirse a la combinación aditiva de los movimientos al azar de miles de partículas del soluto en la zona cromatográfica.

El ancho de la curva está directamente relacionado con el tiempo de retención del soluto en la columna e inversamente relacionado con la velocidad a la cual fluye la fase móvil.

La mayoría de los cromatogramas experimentales, se obtienen con el tiempo como abscisa. Entonces para calcular el número de platos teóricos se tiene :

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

donde:

W es el ancho del pico medido en la base.

t_r es el tiempo de retención, es decir, es el tiempo que se necesita para eluir una sustancia a su concentración máxima.

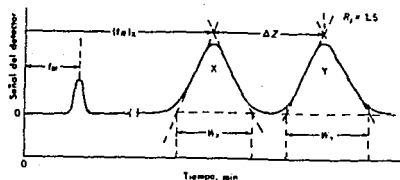
Resolución de una columna

Es la capacidad de una columna para resolver dos solutos; se expresa como:

$$R_s = \frac{2 (t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

donde:

W_2 y W_1 son los anchos de los picos (en unidades de tiempo) en sus bases y $(t_2 - t_1)$ es la diferencia en tiempo de su llegada al detector.



Cuando $R_s = 1.0$ el área de contaminación es del 2 % del área total bajo las curvas, suponiendo que ambos constituyentes se encuentren en la misma concentración. Para reducir la contaminación al 0.1%, la resolución deberá ser de 1.5 o más.

Para el mismo empaque, la resolución puede mejorarse alargando el tamaño de la columna o reduciendo el tamaño de partícula del empaque; así aumentará el número de platos teóricos.

Análisis cuantitativo

La cromatografía cuantitativa se basa en una comparación ya sea de la altura o del área de los picos cromatográficos producidos por las sustancias a cuantificar en comparación con un estándar. Si las condiciones están controladas, estos parámetros varían linealmente con la concentración.

Se obtiene mejor precisión cuando se utiliza un estándar interno debido a que en esta forma se evita la incertidumbre causada por la falta de homogeneidad en el volumen de inyección de la muestra, y se compensa la pérdida de muestra que pudiera ocurrir durante el procedimiento. En esta técnica se añade al compuesto a analizar, otro compuesto de características similares (estándar interno) en una concentración conocida. El estándar interno debe de tener buena resolución respecto a los demás picos, no estar presente en la muestra a analizar, debe de salir cercano al soluto que se desea separar, debe de ser inerte con respecto a la muestra y la fase móvil, y estar disponible en el mercado.

Factor de corrección relativo; factor respuesta:

Para dos componentes i, r, de una mezcla resuelta se cumple:

$$\frac{m_i}{m_r} = \frac{S_i A_i}{S_r A_r}$$

donde m representará el número de moles de un componente.

S es la sensibilidad del detector (señal eléctrica cuando la concentración de un componente, experimenta un cambio de potencial).

A es el área del pico correspondiente a un componente.

i es un determinado componente en la muestra.

r es un compuesto de referencia.

Al cociente S_r/S_i se denomina factor de corrección relativo del componente i respecto al de referencia y se simboliza f_i .

Si se conocen los factores de corrección relativos de las áreas de los picos de un cromatograma con respecto a uno de los componentes, es posible deducir la proporción relativa de todos ellos, teniendo en cuenta que, aún cuando f_i es una magnitud adimensional su valor dependerá de la forma en que se exprese m (en masa o en moles).

Los factores de corrección así determinados representan, más que simples relaciones de sensibilidades del detector de pares de compuestos, verdaderos parámetros correctores de todo el método analítico, incluyendo al propio operador. Sólo así será posible que los resultados obtenidos sobre un mismo problema sean coincidentes en sentido estadístico.

Sea M la cantidad de muestra problema, a la que se ha añadido una cantidad m_p de estándar, y f_i el factor de corrección relativa del componente i , cuya proporción en M quiere conocerse. La cantidad desconocida de i en M es m_i , y la proporción buscada m_i/M 100, de donde:

$$\frac{m_i}{M} \cdot 100 = f_i \frac{m_p}{M} \frac{A_i}{A_p} \cdot 100$$

2.4.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (21-22)

CLAR vs CG

La cromatografía de gases (CG) tiene una gran capacidad para separar y analizar mezclas complejas. Comparada con los métodos cromatográficos existentes, las separaciones por CG fueron más rápidas y mejores contando con un equipo automatizado. Sin embargo, muchas muestras no pueden ser analizadas por CG, ya sea porque no son lo suficientemente volátiles y no pueden pasar a través de la columna, o porque son térmicamente inestables y se descomponen bajo estas condiciones de separación. Se estima que solo el 20% de los compuestos orgánicos conocidos pueden ser satisfactoriamente separados por CG, sin una previa modificación química de la muestra.

La cromatografía de líquidos (CLAR) no se ve limitada por la volatilidad de la muestra o la estabilidad térmica. Además, la CLAR es ideal para la separación de macromoléculas, especies iónicas, productos naturales, etc.

Muchas separaciones difíciles se logran mejor por CLAR que por CG porque:

- Las dos fases cromatográficas en CLAR tienen interacción selectiva con las moléculas de la muestra, en CG existe sólo con una fase.

Además, la CLAR tiene una mayor variedad de detectores:

- Colorimétricos
- Amperométricos
- Detectores de índice de refracción
- Absorción UV -visible y fluorescencia

Una ventaja más de la CLAR vs CG es la relativa facilidad de recobro de la muestra. Fracciones separadas son fácilmente recolectadas en CLAR., mientras que con la CG, algunos detectores destruyen la muestra y no es posible recuperarla.

CLASIFICACION

Existen muchas formas para dividir la cromatografía de líquidos en columna. Si esta clasificación está basada en la naturaleza de la fase estacionaria y en el proceso de separación, se especifican cuatro divisiones:

- Cromatografía de adsorción: la fase estacionaria es un adsorbente y la separación está basada en pasos repetidos de adsorción-desorción.
- Cromatografía de partición: basada en la partición entre las fases móvil y la fase estacionaria.
- Cromatografía de intercambio iónico: La fase estacionaria tiene

una superficie iónica de carga opuesta a la muestra.

Entre mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será retenida. La fase móvil es una solución reguladora acuosa, donde el pH y la fuerza iónica son usados para controlar el tiempo de elución.

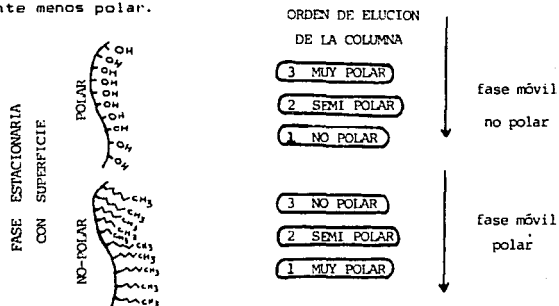
- Exclusión cromatográfica: la columna está empacada con material cuyo tamaño de poro está controlado, la muestra es filtrada de acuerdo a diferencias de tamaño molecular. También se le conoce como Cromatografía de permeación en Gel.

En algunas ocasiones, no se sabe cual es el proceso dominante, si adsorción o partición o ambos. Por esta razón se definen dos divisiones más dependiendo de la polaridad relativa de las dos fases: Cromatografía de fase normal y Cromatografía de fase inversa.

En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es fuertemente polar (sílica), y la fase móvil, no-polar (como hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares son retenidas en la columna más tiempo que los compuestos menos polares.

En la cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es no polar (hidrocarburos), mientras que la fase móvil es un líquido polar como el agua o el alcohol. Los compuestos no-polares se retienen más tiempo.

Algunas veces, la fase móvil puede ser modificada ajustando su polaridad, en la fase normal esto puede ser hecho adicionando un disolvente más polar; y en la fase inversa, adicionando un disolvente menos polar.



La cromatografía de líquidos de alta resolución se caracteriza por:

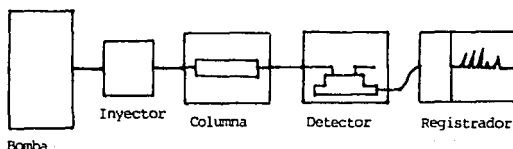
- Diámetro de la columna pequeño (2-5 mm),
- Empaques de columna con partículas muy pequeñas y variedad de reactivos para ser usados como fase estacionaria;
- Presiones de inyección relativamente altas y flujo de fase móvil controlado;
- Introducción precisa de la muestra, sin necesitar muestras muy grandes;
- Bombas de alta presión capaces de mantener flujos de fase mó-

vil pequeños y controlados, que permitan una operación más reproducible.

- Detectores capaces de analizar cantidades muy pequeñas;
- Instrumentos automatizados estandarizados;
- Análisis rápido y
- Alta eficiencia.

SISTEMA CROMATOGRAFICO

Los componentes básicos de este sistema son una bomba que impulsa la fase móvil; un inyector para introducir la muestra; una columna conteniendo la fase estacionaria; un detector para determinar que separación ha tenido lugar, y un registrador y/o integrador que provee la información cualitativa y cuantitativa de los resultados ya sea en forma de cromatogramas (curva de respuesta vs tiempo) y/o cálculo de áreas.



Esquema de un aparato empleado en cromatografía de líquidos de alta resolución.

Los detectores más frecuentemente usados en CLAR son los detectores ópticos. Las variaciones en la intensidad de luz causadas por la absorción UV-visible, fluorescencia o índice de refracción resultantes de la interferencia encontrada al pasar los componentes de la muestra a través de la celda, son monitoreados como cambios de voltaje los cuales son registrados en un integrador.

El detector en CLAR más común es de absorción UV-visible capaz de monitorear en el intervalo de 190 a 800 nm.

FASE MOVIL

Excepto en la cromatografía de exclusión, la fase móvil juega un papel activo en el sistema CLAR.

Se puede utilizar una composición constante de la fase móvil durante un análisis, o bien, ir variando dicha composición. A la primera forma se le llama operación isocrática y a la segunda, - gradiente de elución.

Esta última se utiliza si los componentes de la muestra tienen una diferencia muy grande de polaridad. (Ver tabla No.2).

La elección del líquido usado como fase móvil depende de ciertos parámetros. En la cromatografía de partición y de adsorción la polaridad es muy importante, sin embargo, ciertas características como la viscosidad pueden influir en el sistema cromatográfico.

Se seleccionan velocidades de flujo bajas, ya que la eficiencia se incrementa al disminuir el flujo. La velocidad de flujo clásica varía de 1-2 ml/min con columnas de 2-5 mmDI.

FASE ESTACIONARIA

La separación de la muestra se completa al interaccionar con la fase estacionaria.

Esta fase es un sólido poroso. La mayoría de los empaques tienen la fase estacionaria químicamente enlazada a un soporte de partículas. A esto se le llama fase enlazada.

Estas fases enlazadas son preparadas por la reacción química de los grupos hidroxil de las partículas de sílica y una molécula orgánica lineal.

También existen fases enlazadas polares con otros grupos, por ejemplo; ciano o amino al final de la cadena de hidrocarburos, pero las de más amplio uso son las fases no polares con una cadena alquil (octadecil) enlazada al alquilsilano.

El tamaño de partícula es muy importante para que la fase móvil y el disolvente de la muestra difundan rápidamente; estas partículas deben ser lo más pequeñas posibles para acercarse a las condiciones ideales donde la muestra es expuesta a la máxima

cantidad de superficie del empaque. El promedio de este tamaño es de 5 a 15 μ m.

Las columnas típicas son de 25-50 cm de largo con un diámetro interno de 2-5 mm.

TABLA NO.2 FASES ESTACIONARIAS Y FASES MOVILES ESTUDIADAS

TIPO	FASE	ESTACIONARIA	FUNCIONALIDAD	FASE MOVIL	APLICACIONES
ADSORCION		GEL DE SILICE	OH OH -Si-O-Si-	HEXANO CLOROFORMO ISOPROPANOL	ESTERES, PORFIRINAS ETERES, MICOTOXINAS VITAMINAS LIPOSOLUBLES
		ALUMINA	Al-O-Al		ANILINAS
		AMINO	-NH	HEXANO CLOROFORMO ISOPROPANOL	AZUCARES, ESTEROIDES NITRODERIVADOS
FASE MOVIL	F	CIANO	-CN		ANILINACIDOS NITRODERIVADOS
	A				
	S				
R	E	DICL	GLICIDOXIETIL METOXISILANO	AGUA Me ₂ CHO ₂	PROTEINAS PEPTIDOS
E	S				
P					
A	E				
R	N				
T	L	RP-2	DIMETILSILANO	AGUA	ANILINAS, FENOLAS
O	A	C-2		ACETONITRILLO METANOL	VITAMINAS HIDROSOLUBLES
	Z				
FASE INVERSA	A	RP-8	OTILSILANO		CATECOLAMINAS, ESTEROIDES
	D	C-8		THF	ACEITES ESENCIALES
	A			SOLUCION	
	S			APORTISUADORA	
		RP-18	OCTADECILSILANO		ANALGESICOS, FALATOS
		C-18			AROMATICOS POLINUCLEARES

CROMATOGRAFIA DE FASE INVERSA (21-22)

En la actualidad más del 70% de los análisis de CLAR se realizan mediante sistemas de fase inversa.

Las mezclas más comunes de fase móvil empleadas en fase inversa son metanol-agua o acetonitrilo-agua.

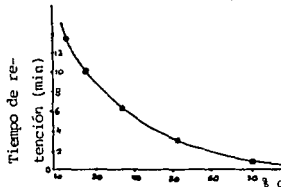
El mecanismo de separación de las fases enlazadas empleando fase inversa no es sólo efecto de partición. Hay por lo menos tres mecanismos de separación que ocurren simultáneamente: adsorción, partición y tensión superficial.

Esta teoría hace posible explicar el uso de la fase inversa en la separación no sólo de compuestos no polares los cuales siguen el principio de que " lo similar disuelve a lo similar" descrito por la teoría de partición, sino también de la separación de especies polares. Estas separaciones se efectúan utilizando las propiedades de tensión superficial del empaque.

A altas concentraciones de agua, las fuerzas de tensión superficial entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria tienden a ser altas; si se añade un modificador orgánico a la fase móvil, la tensión superficial del enlace se reduce y los componentes eluyen.

La fase móvil usual es una mezcla de agua con un disolvente miscible, menos polar como metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dioxano, etc. Si se incrementa la concentración del disolven-

te menos polar, se decrecientan los tiempos de retención.



La elección del componente menos polar depende de la solubilidad de la muestra, viscosidad de la fase móvil y eficiencia del sistema.

CROMATOGRAFIA PAR-IONICO

La cromatografía de partición par-iónico se utiliza preferentemente en materiales que se encuentran ionizados y que son altamente insolubles en agua.

Generalmente, las columnas de fase inversa son las más efectivas para la separación de compuestos no-iónicos. En el caso de ácidos y bases débiles con valores de pK_a entre 2 y 8 (pH que toleran las columnas), la actividad iónica se suprime con una solución reguladora en la fase móvil. Para ácidos y bases fuertes cuyos valores de pH están fuera de estos límites, su ionización no puede ser suprimida.

Para estos compuestos se recurre a la cromatografía par-iónica.

Existen dos teorías que explican el mecanismo de este tipo de cromatografía; la primera de ellas dice que el propósito del par-iónico es agregar un segundo ión (contra-ión) al eluyente que al combinarse con los iones de la muestra, crean un par iónico neutro el cual seguirá el proceso de partición normal entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La segunda teoría dice que la cromatografía de par-iónes puede ser utilizada para modificar la fase estacionaria, en este caso el contraión se adsorbe en el empaque, los iones de la muestra con carga opuesta se unen a esta nueva superficie. El exceso de contraión en la fase móvil mantiene constante la concentración del mismo en la fase estacionaria.

Otros factores que ayudan a una resolución óptima son: el tipo y concentración del contraión, el pH y la composición de la fase móvil, siendo la columna más frecuentemente usada la C-18.

A fin de asegurar que todos los iones fuertes estén completamente ionizados, se emplean contraiones con valores de pK_a muy altos o muy bajos. La selección del contraión depende de la muestra.

Las muestras básicas son analizadas usando la sal sodica de alquil sulfonato, con el pH ajustado a 3 con ácido acetico glacial.

Para muestras ácidas se emplea fosfato de tetrabutil amonio a un pH de 7.5.

En ambos casos, la concentración del contraion es de 0.003 a 0.005 M, la cual es suficiente para asegurar la completa ionización de la muestra sin introducir efectos indeseados de saturación del detector o formación de cristales en el sistema.

2.5 DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO POR CLAR

A fin de determinar cual metodo analitico por CLAR es el mejor para analizar un compuesto determinado en una muestra, se consideran los siguientes puntos:

- Naturaleza de la muestra.
- El tipo de separación selectiva requerida.
- Conveniencia experimental.

NATURALEZA DE LA MUESTRA

Se realiza una investigación bibliográfica de las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de la sustancia. La propiedad más importante es la solubilidad relativa en agua vs. solventes orgánicos. Posteriormente tamaño o peso molecular, y su pKa. (Ver tabla No. 3).

SEPARACION SELECTIVA

Se busca en la mayoría de los casos, el efectuar por lo menos una separación parcial previa de todos los componentes de la muestra, esto con la finalidad de introducir esta lo más pura posible a la columna y así alargar la vida de la misma. Escoger un procedimiento que sea exitoso en la separación de sustancias muy similares requiere del conocimiento del mecanismo de

retención de los diferentes métodos.

CONVENIENCIA EXPERIMENTAL

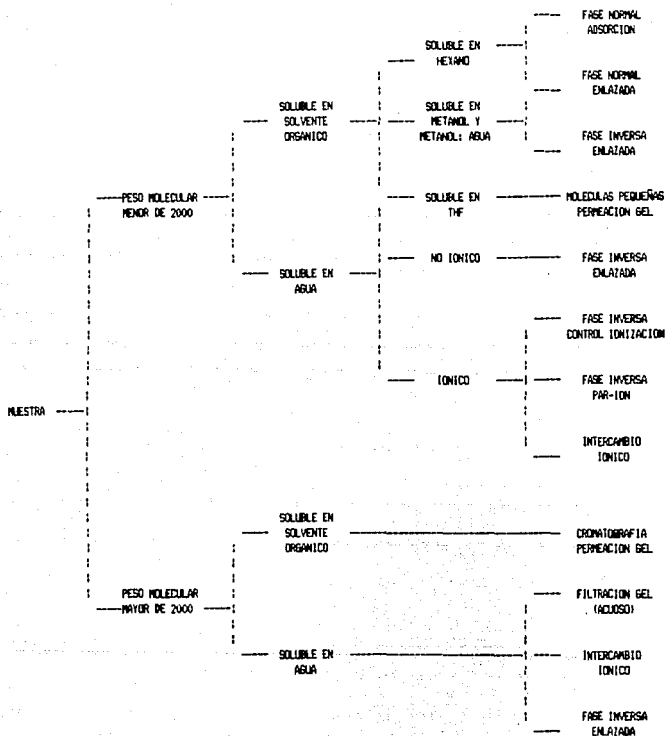
El método debe proveer una adecuada resolución de la muestra con un mínimo de esfuerzo.

Algunos factores que deben de considerarse son :

- Preparación de la muestra.
- Tiempo para efectuar el análisis.
- Estandar interno fácilmente asequible y estable.
- Costo del análisis.
- Aplicable a estudios de estabilidad y análisis rutinario.
- Tiempo de vida de la columna.
- Estabilidad del sistema.
- Facilidad para desarrollar y validar el método.
- Disponibilidad de materiales y reactivos.
- Experiencia previa en el método.

TABLA NO.3

SELECCION DEL METODO ANALITICO POR CLAR



2.6 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (28-30)

La finalidad de obtener medicamentos cada vez mejores ha sido facilitada por la adopcion y práctica de métodos de análisis reconocidos como correctos y efectivos. Tal reconocimiento se ha logrado mediante la validación de los mismos.

Una definición del término validación es la siguiente:

" Proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas."

La validación, por lo tanto, implica el poner a prueba una técnica analítica con el objeto de determinar si los parametros establecidos durante su desarrollo, nos permitirán cuantificar al compuesto de interés de una manera precisa, exacta y específica.

Cada producto tiene su propia idiosincrasia, por lo tanto, requiere de pruebas especiales para lograr tal objetivo.

En un programa de validación los resultados obtenidos deben de registrarse adecuadamente (documentarse) y evaluarse estadísticamente.

Las variables involucradas en la validación de técnicas analíticas son:

- Material que se analizará.
- Materiales y reactivos utilizados en el análisis.
- Equipo, instrumentos o materiales para calibración.
- Químicos analistas.
- Factores ambientales.
- Instrumentos o aparatos en sí.

El seguimiento de una validación, dependerá de la aplicación que se dará a la misma (Control de Calidad y/o estudios de estabilidad), disposiciones gubernamentales, lineamientos internos del laboratorio donde se efectúe y del criterio del analista.

La guía general para validar un método analítico involucra los siguientes experimentos:

1. Especificidad
2. Linealidad del sistema
3. Precisión del sistema
4. Precisión del método
5. Exactitud del método
6. Estabilidad de la muestra

PARTE EXPERIMENTAL

"Pues bien, le di a mi mente un reposo completo sumiéndola en un análisis químico".

A.C. Doyle

3.1 DESARROLLO DEL SISTEMA

Los métodos analíticos usados más frecuentemente para cuantificar pseudoefedrina, usan sistemas por cromatografía de gases, (9). Al probar uno de estos sistemas que emplea una columna de vidrio de 4 pies x 1/4 plg con 1.2% de Carbowax 20 M, sobre Cromosorb WHP 100/120 con 0.1% de KOH, se encontró que la recuperación de la pseudoefedrina no se lograba al 100% debido a problemas de extracción durante la preparación de la muestra.

Al realizar el análisis de costos y de conveniencia experimental, se optó por desarrollar un método por CLAR.

El objetivo de este proyecto fue desarrollar y validar un método analítico que permitiera cuantificar sulfato de pseudoefedrina en una solución oral, tanto para el control de calidad como para estudios de estabilidad del producto.

Inicialmente, se probaron las columnas M-Bondapak C-18, fenil, CN y NH₂ ensayando diferentes fases móviles como metanol/agua, metanol/sal sódica del ácido octano sulfónico/ácido acético, metanol/fosfato de amonio, variando la proporción de las mismas.

En ninguno de estos casos se logró la separación de la pseudoefedrina de los conservadores presentes en la muestra.

Dados los resultados anteriores, se decidió eliminar a estos últimos empleando una pre-columna C-18 (SEP-PAK), de la cual, al

filtrar la muestra, y al ser lavada con agua, eluye únicamente la pseudoefedrina y quedan retenidos los conservadores. Estos pueden ser eluidos posteriormente con un disolvente menos polar como el metanol. Ver Figura No. 1, Tratamiento de las muestras.

Teniendo como antecedente bibliográfico que la pseudoefedrina es una amina cuaternaria para la cual está recomendada el uso de cromatografía de fase inversa, en cuyas columnas pueden ser retenidos estos compuestos iónicos mediante el control del pH y/o la adición de modificadores a la fase móvil, se optó por explorar esta posibilidad.

Se descartó esta opción (supresión iónica) ya que la pseudoefedrina tiene un pK_a de 9.5 y para tenerla no ionizada, se requeriría tener un pH mayor a 11, lo cual no es recomendable para columnas basadas en sílica, en las que se sugiere usar fases móviles de pH no mayor a 7.5.

Por lo tanto, se decidió investigar el uso de agentes modificadores. Se seleccionó inicialmente un buffer de fosfato de amonio con el siguiente sistema cromatográfico:

Columna:	M-Bondapak CN
Flujo:	1.5 ml/min
Detector:	U.V. 254 nm
Fase móvil:	Fosfato de amonio 0.05 M, pH 6.5/ metanol 80:20
Tiempos de retención aprox.:	Pseudoefedrina 3 min Etilparabeno (estándar interno) 5 min

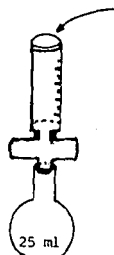
FIGURA No. 1

TRATAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS

1. Humectar el SEP PAK C18 con 2 ml de metanol y después con 5 ml de agua.



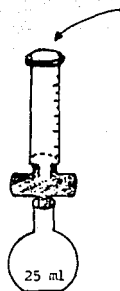
2. Colocar el SEP PAK sobre un matraz volumétrico de 25 ml. Poner 2.0 ml de muestra en la jeringa.



3. Lavar la pipeta con 2 ml de agua, recibiendo en la jeringa. Filtrar la muestra gota a gota a través del SEP PAK.



4. Lavar la jeringa y el SEP PAK
con 2 porciones de 6 ml de agua
filtrando a través del SEP -
PAK.



5. Quitar la jeringa y el SEP PAK
Agregar 5.0 ml de solución de
estándar interno.
Diluir a volumen con agua.



6. Inyectar 20 microlitros en el
cromatógrafo.



NOTA: Lavar el SEP PAK con 9 ml de metanol, seguido de 10 ml de
agua, y la pre-columna está lista para ser nuevamente
usada. Asegurarse que la pre-columna esté completamente
libre de metanol.

Este método se validó (ver capítulo correspondiente) y resultó ser específico; exacto ($\bar{x}$ = 101.15 %, D.E.R. = 1.26%) con m = 1.0495, b =0.026 y r =0.9999; lineal (b =-0.04, m =1.77, r =0.9999); preciso ($\bar{K}_c$ =0.455, D.E.R. =0.73%), y no se encontró diferencia entre los resultados obtenidos en dos días diferentes, ni tampoco entre los resultados obtenidos por dos analistas diferentes al analizar muestras del producto terminado. Donde $\bar{x}$ es el valor promedio, D.E.R. es la desviación estándar relativa, m es la pendiente, b es la ordenada al origen, r es el factor de correlación de una línea recta y $\bar{K}_c$ es el factor respuesta.

Sin embargo, al efectuar el análisis de estabilidad de las muestras almacenadas durante 6 meses, se observaron productos de degradación de los excipientes (que no fueron detectados durante el proceso normal de validación), en las muestras almacenadas a 35° C y a 45°C, que no logramos resolver de la pseudoefedrina ni aún variando los parámetros cromatográficos dentro de los límites pre-establecidos en la prueba de tolerancia.

Por lo tanto esta técnica analítica aunque ya validada y factible de ser empleada para el Control de Calidad del producto, se rechazó pues no sería útil para estudiar la estabilidad del mismo.

Revisando el trabajo hecho con anterioridad, se observó que una vez eliminados los conservadores con la precolumna C-18, una co-

lumna de este tipo si sería capaz de resolver los productos de degradación encontrados.

El sistema desarrollado en esta segunda ocasión, emplea una columna M-Bondapak C-18, flujo de 1.5 ml/min y una fase móvil de metanol/ácido 1-octanosulfónico sal sódica 0.01 M/ácido acético en una proporción 50:50:1, empleando como estándar interno nafazolina. Ver tabla No. 4.

Para realizar el análisis de muestras empleando el sistema antes propuesto, se hace uso de los reactivos y soluciones estándar enlistados en la tabla No.5.

Se realizó la prueba de tolerancia, con objeto de optimizar los parámetros cromatográficos. Se varió el número de platos teóricos, la proporción de fase móvil y el flujo, alrededor de los valores establecidos durante el desarrollo del método. Observando la variación que se producían en los tiempos de retención y por lo tanto en la resolución de las sustancias de interés. Ver tablas 6,7 y 8.

En cuanto al número de platos teóricos, conforme se emplean columnas de mayor vida media se mejora la resolución del producto de interés con respecto a los excipientes o productos de degradación y al estándar interno. Al incrementar la proporción de fase orgánica disminuyen los factores de resolución, lo mismo se observa al aumentar el flujo de la fase móvil.

TABLA No. 4

PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

1. Instrumento	Cromatógrafo de líquidos
2. Columna	M Bondapak C18 30cm x 4mm de acero inoxidable.
3. Detector	UV fijo a 254 nm.
4. Fase móvil	metanol / sal sódica del ácido 1-octano sulfónico 0.01M/ácido acético 50:50:1
5. Flujo	1.5 ml/min.
6. Estándar interno	Nafazolina 0.05 mg/ml
7. Tiempos de retención aproximados	Pseudoefedrina 5 min Nafazolina 10 min

TABLA No. 5.

REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTANDAR

- Metanol
- Sal sódica del ácido 1-octano sulfónico
- Ácido acético glacial
- Fase móvil:
 - . Mezclar metanol / agua en una proporción 50:50
 - . Añadir la sal sódica del ácido 1-octano sulfónico para obtener una solución 0.005 M. Agregar ácido acético para obtener una solución al 1%.
 - . Filtrar a través de un filtro de 0.22µ usando vacío y agitación lenta 15 min.
- Solución Estándar Interno:

Pesar exactamente cerca de 25 mg de nafazolina y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml. Anotar el peso, Pi. Disolver y diluir a volumen con agua.
- Solución Estándar de Sulfato de Pseudoefedrina:

Pesar exactamente cerca de 94 mg de estándar de referencia de sulfato de pseudoefedrina y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml. Anotar el peso, Ps. Disolver y diluir a volumen con agua.
- Solución Estándar Factor Respuesta:

Transferir 5.0 ml de la solución estándar de sulfato de pseudoefedrina a un matraz volumétrico de 25 ml. Agregar 5.0 ml de solución estándar interno. Diluir a volumen con agua.

TABLA NO.6 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (NPT)

A.- MUESTRAS A T.A.

NPT*	TIEMPO	DE		RETENCION	FACTOR	DE	RESOLUCION
	E	P		N			P/N
1863	2.92	5.70		10.25	5.67		5.58
1317	2.59	4.02		6.17	3.71		3.91
1052	2.36	4.28		6.65	3.88		3.43

B.- MUESTRAS A 45° C DURANTE 8 MESES

NPT*	TIEMPO	DE		RETENCION	FACTOR	DE	RESOLUCION
	D	P		N			P/N
1863	2.92	5.70		10.32	5.10		5.37
1317	2.60	4.03		6.16	2.65		3.20
1052	2.68	4.27		6.63	2.68		3.01

*NPT EVALUADOS CON NAFAZOLINA

NOTA: D = PRODUCTO DE DEGRADACION

P = PSEUDOEEDRINA

E = EXCIPIENTES

N = NAFAZOLINA

TABLA NO.7 PROPORCION DE FASE MOVIL

A.- MUESTRAS A T.A.

METANOL : AGUA	TIEMPO DE RETENCION			FACTOR DE RESOLUCION	
	E	P	N	E/P	P/N
45:55	2.55	7.37	16.70	9.74	9.19
50:50	2.92	5.70	10.25	5.67	5.58
55:45	2.32	4.55	7.20	6.56	4.49

B.- MUESTRAS A 45 C DURANTE 8 MESES

METANOL : AGUA	TIEMPO DE RETENCION			FACTOR DE RESOLUCION	
	D	P	N	D/P	P/N
45:55	3.37	8.17	17.92	6.71	7.12
50:50	2.92	5.70	10.32	5.10	5.27
55:45	2.67	4.55	7.17	4.88	4.40

NOTA : La concentracion de la sal sodica del acido 1-Octanosulfonico, y del acido acetico glacial permanecio constante.

TABLA NO. 8 FLUJO

A.- MUESTRAS A T.A.

ml/min.	TIEMPO DE RETENCION			FACTOR DE RESOLUCION	
	E	P	N	E/P	P/N
1.0	4.47	8.92	16.57	7.42	7.08
1.5	2.92	5.70	10.25	5.67	5.58
2.0	2.20	4.22	7.42	6.41	5.52

B.- MUESTRAS A 45° C. DURANTE 8 MESES

ml/min.	TIEMPO DE RETENCION			FACTOR DE RESOLUCION	
	D	P	N	D/P	P/N
1.0	4.52	8.92	16.45	6.07	6.52
1.5	2.92	5.70	10.32	5.10	5.37
2.0	2.22	4.22	7.37	5.41	5.04

En base a los resultados antes expuestos, se puede establecer que el sistema propuesto es tolerante a ciertos cambios en la composición de la fase móvil y flujo a partir del punto central, ya que la resolución de los picos de interés es de 1.5 o más.

Con respecto al número de platos teóricos, se recomienda un mínimo de 1052 evaluados con respecto a Nafazolina para asegurar la adecuada resolución de los picos de interés; con un menor número de platos teóricos no se asegura un factor de resolución dentro de los límites establecidos antes mencionados.

3.2 VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Todas las muestras de producto terminado y sus placebos fueron acondicionadas en frascos de polietileno de alta densidad y en vidrio ámbar tipo III, que se utilizaron durante la validación, para analizarlas se trataron como se muestra en la figura No.1. El contraíón empleado en la técnica de par-iónico que se trabajó, fue la sal sódica del ácido 1-octano sulfónico.

Los cálculos para cuantificar a la pseudoefedrina, se hicieron de la siguiente forma, usando para los factores respuesta las áreas obtenidas de la inyección de soluciones estándar, y para el cálculo de la concentración de la pseudoefedrina, las áreas obtenidas de las muestras de producto terminado.

$$K = \frac{A_p}{A_i} \times \frac{P_i}{100} \times \frac{5}{25} \times \frac{25}{P_p} \times \frac{25}{5}$$

$$K = \frac{A_p}{A_i} \times \frac{P_i}{P_p} \times \frac{25}{100}$$

$$\text{mg/ml pseudoefedrina sulfato} = \frac{1}{K} \times \frac{A_p}{A_i} \times \frac{P_i}{P_p} \times \frac{5}{100}$$

Donde:

A_p = Area del sulfato de Pseudoefedrina

A_i = Area de la Nafazolina

F_p = Peso del sulfato de Pseudoefedrina ,mg

P_i = Peso del estándar interno Nafazolina, mg

A'_p = Area del sulfato de Pseudoefedrina

A'_i = Area de la Nafazolina

V_p = Volumen de la muestra,ml

Para efectuar la validación del método analítico desarrollado se realizaron los siguientes experimentos:

1.ESPECIFICIDAD

Es la capacidad que tiene un sistema cromatografico de resolver del pico de interés los otros componentes que den señal en el detector (productos de degradación,excipientes,otros activos),es decir,es el grado en que la medición se debe sólo a la sustancia por determinar y no a otras que pueden estar presentes en el material a analizar.

En el caso de que esta prueba se aplique a una técnica que vaya a ser utilizada para estudios de estabilidad,se hace un estudio de las sustancias que pueden presentarse durante el periodo de

almacenamiento del producto en condiciones normales o específicas de temperatura, luz, humedad, pH, agentes oxidantes, etc. durante un periodo determinado.

Se obtuvieron cromatogramas de las muestras de producto terminado, placebo y soluciones estándar que a continuación se enlistan, siendo analizadas bajo las condiciones cromatográficas mencionadas en la tabla No. 4 .

1. Estándares

- a) Pseudoefedrina
- b) Nafazolina
- c) Factor respuesta

2. Producto terminado, almacenado a:

- a) Temperatura ambiente, (T.A.) con estándar interno
- b) Temperatura ambiente, sin estándar interno
- c) 70°C durante 15 días, sin estándar interno
- d) 45°C durante 8 meses, sin estándar interno

3. Placebo de sulfato de Pseudoefedrina

- a) Temperatura ambiente, sin estándar interno
- b) 70°C durante 15 días, sin estándar interno
- c) 45°C durante 15 días, sin estándar interno

Observando los cromatogramas que se muestran en las figuras No. 2 a 5, se concluye que no hay sustancias que interfieran con los picos de interés, ya que en los cromatogramas correspondientes a los placebos no se observan picos en los mismos tiempos de retención de la pseudoefedrina y nafazolina, por lo tanto el método es específico bajo el sistema cromatográfico establecido.

2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Con esta prueba, se pretende demostrar que el sistema cromatográfico origina una respuesta lineal dentro de un rango de concentraciones del principio activo, en cuyo punto intermedio se encuentra el 100% de la cantidad a cuantificar por el método de análisis, es decir, mide el grado en el que una curva de calibración se aproxima a una línea recta.

Esta prueba se realiza construyendo una curva de calibración con estándares de cuando menos 5 concentraciones diferentes.

Así, se observa la capacidad del sistema para asegurar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del principio activo en la muestra.

La curva de calibración se realiza graficando el cambio de la

señal del detector (Área, absorbancia, etc.) vs el cambio de concentración de la sustancia analizada. En dicha curva, siguiendo la ecuación de una línea recta $y = Ax + B$, se determina el coeficiente de correlación (r) el cual deberá de aproximarse a la unidad, y la ordenada al origen deberá tender a cero para asegurar que estamos trabajando con un sistema lineal.

La prueba se llevó a cabo usando soluciones estándares de pseudo-efedrina (P); que se prepararon en un intervalo de concentraciones del 60 al 140% de la concentración teórica de dicho principio activo normalmente utilizada para el análisis, manteniendo constante la concentración del estándar interno, nafazolina.

Se determinaron las relaciones de áreas entre el principio activo (P) y el estándar interno (N). Ver tabla No. 9.

Se graficaron los resultados obtenidos (Gráfica No. 1); se observa que la respuesta del detector es lineal y sigue la ecuación de una línea recta $y = Ax + B$.

Donde el factor de correlación es 0.997 y la ordenada al origen es de 0.014, significativamente igual a cero, con lo cual se concluye que el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones estudiado.

3. PRECISION DEL SISTEMA

Con esta prueba se pretende demostrar que el sistema analítico es capaz de detectar siempre la misma cantidad de un principio activo con la mínima variación posible cuando es analizada varias veces.

En la presente validación, esta prueba se realizó preparando una solución estándar de sulfato de pseudoefedrina en una concentración igual al 100% de la cantidad establecida para realizar el análisis de las muestras. Esta solución se inyectó 6 veces.

Se determinó la media ($\bar{X}$) y la desviación estándar relativa (D.E.R.), calculando el factor respuesta de la siguiente manera:

$$Kc = \frac{\text{AREA PSEUDDEFEDRINA}}{\text{AREA ESTANDAR INTERNO}} \times \frac{\text{CONC. ESTANDAR INTERNO}}{\text{CONC. PSEUDDEFEDRINA}}$$

De acuerdo con los resultados que se muestran en la tabla No. 10 se concluye que el sistema es preciso bajo estas condiciones ya que la D.E.R. es menor al 2% (0.53%).

Donde D.E.R. = (D.E. / $\bar{X}$) 100.

4.PRECISION DEL METODO

Esta prueba tambien puede expresarse como reproducibilidad del método; es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes desarrolladas por analistas y días diferentes usando el mismo equipo y siguiendo el mismo metodo analítico. En ella se se puede apreciar la variación en los resultados del análisis ocurridos durante la preparación de la muestra.

Esta prueba se realizo analizando 3 muestras del producto terminado, dos días diferentes, realizadas por dos químicos.

Se realizaron 6 análisis cada día para dar un total de 12 análisis cuyos resultados se muestran en la tabla No.11.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que la técnica es reproducible ya que tiene una desviación estándar relativa menor del 2%, y no existe variación entre los resultados obtenidos inter día ni interanalista.

5.EXACTITUD DEL METODO

También conocida como prueba de efecto placebo.

Es la concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia; esta concordancia nos dice qué tanto los

resultados promedio de un método se alejan del valor real o verdadero de la muestra.

Esta prueba es importante ya que en muchas ocasiones, por ejemplo, al manufacturar el producto, no se agrega el 100% de la cantidad de principio activo establecida en la formulación, por lo que se hace necesario el poder cuantificar exactamente el principio activo aún cuando varíe la relación principio activo - excipiente.

La prueba de efecto placebo se realizó preparando 5 muestras de placebo a las que se les añadió solución estándar de pseudoefedrina en diferentes proporciones para tener el 60, 80, 100, 120 y 140% de la concentración normal del principio activo (P), simulando así las condiciones de falta o exceso del mismo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No.12 donde se observa que el porcentaje recuperado de pseudoefedrina en todos los niveles de la prueba es cercano al 100% con una D.E.R. de 0.32% (menor del 2% requerido para aceptar la técnica como exacta).

Con los resultados obtenidos en la prueba de efecto placebo se realizó un análisis estadístico para determinar la linealidad del método.

Los resultados de este análisis se muestran en la tabla No. 13, de acuerdo con los cuales se asume que el método es lineal dentro

del intervalo de concentraciones estudiadas, ya que su coeficiente de correlación lineal es de 0.9999, y sin sesgo ya que se obtiene una pendiente significativamente igual a uno y una ordenada significativamente igual a cero.

Conforme a los resultados anteriores, se puede establecer que el método es capaz de cuantificar la concentración real de pseudo - efedrina aún cuando la relación principio activo-excipiente varíe.

6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Esta prueba se realiza para comprobar que la muestra ya lista para ser inyectada es estable a T.A. y/o en refrigeración, ya que éstas son las condiciones en que normalmente se almacena la muestra cuando no es posible realizar su análisis el mismo día en que se preparó.

Esta prueba se efectuó preparando 6 muestras que se analizaron el mismo día de su preparación; estos datos se tomaron como referencia.

Estas muestras se guardaron (bien tapadas) a T.A. y a 5°C por 3 y 5 días para analizarse al término de cada periodo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 14

Las muestras almacenadas en refrigeración no se analizaron, ya

que los resultados obtenidos de las muestras a T.A. indicaron que el principio activo permanecía estable bajo estas condiciones por lo que no se vió la necesidad de emplear refrigeración.

Basados en estos resultados, es posible fijar la estabilidad de la muestra ya lista para ser inyectada en el cromatógrafo en 5 días si es almacenada a T.A.

FIGURA No. 2

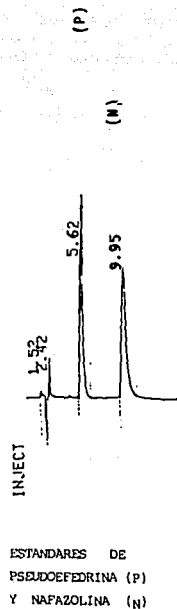
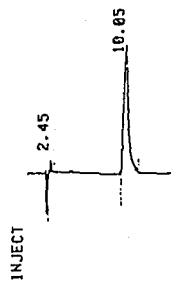
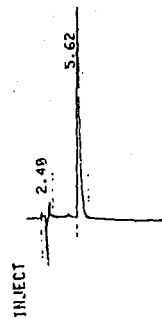
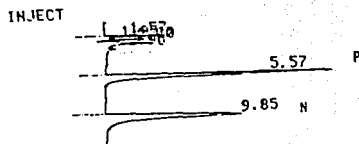


FIGURA No.3

MUESTRA A T.A. CON
ESTIMADOR INTERNO



MUESTRA A T.A. SIN
ESTIMADOR INTERNO

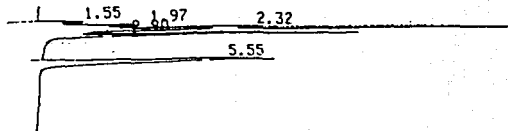


FIGURA No. 4

SIN ESTIMAR INTERNO

700/15 DIAS

MUESTRA



SIN ESTIMAR INTERNO

450/8 MESES

MUESTRA

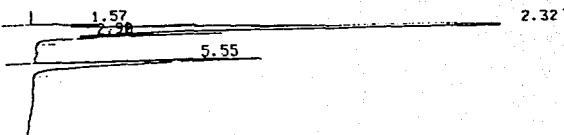
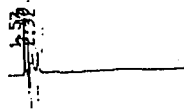


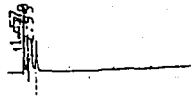
FIGURA No. 5

INJECT



A T.A.

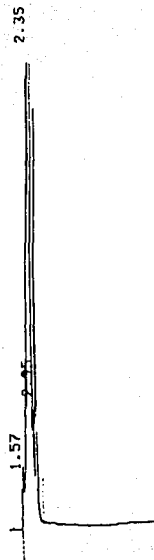
INJECT



PLACEROS DE SULFATO DE PSEUDOEFEDRINA
SIN ESTANDAR INTERNO

A 45C/15 DIAS

INJECT



A 70C/15 DIAS

TABLA NO. 9 LINEALIDAD DEL SISTEMA

% DEL NIVEL ENSAYADO	CONCENTRACION DE PSEUDO- EFEDRINA SULFATO (mg/ml)	RELACION DE AREAS P/N
60	0.4498	0.5558
80	0.5997	0.7363
100	0.7496	0.8691
120	0.8995	1.0737
140	1.0494	1.2744

La ecuación de la línea recta es:

$$Y = Ax + B$$

Donde "Y" es la relación de áreas y "X" es la concentración de Pseudoefedrina (mg/ml)

Por análisis de mínimos cuadrados:

$$A = 1.1839$$

$$B = 0.0144$$

$$r = 0.9974$$

LINEALIDAD PSEUDOFEDRINA

GRAFICA 1

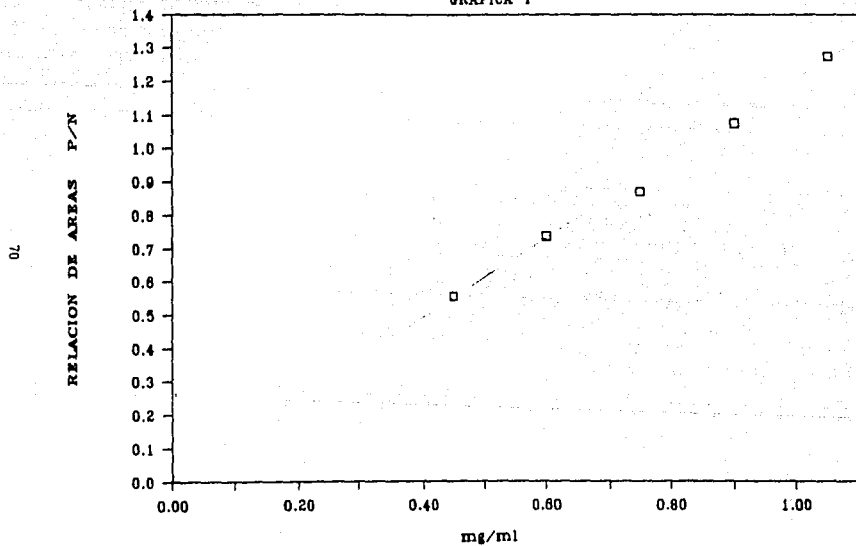


TABLA NO.10 PRECISION DEL SISTEMA

INYECCION NO.	FACTOR RESPUESTA (Kc)
1	0.0579
2	0.0578
3	0.0583
4	0.0582
5	0.0586
6	0.0579

$$\bar{X} = 0.0581$$

$$D.E.R. = 0.53\%$$

TABLA NO.11 PRECISION DEL METODO

MUESTRA	QUIMICO	DIA	PSEUDOFEDRINA SULFATO (%)
1	1	1	103.11
2	1	1	104.25
3	1	1	103.92
4	2	1	104.80
5	2	1	103.80
6	2	1	105.42
7	1	2	105.07
8	1	2	105.22
9	1	2	104.31
10	2	2	106.24
11	2	2	104.92
12	2	2	104.60

$$\bar{X} = 104.64$$

$$D.E.R. = 0.80\%$$

ANALISIS ESTADISTICO

SUMA PARA CADA ANALISTA

Yi

$$\sum Y_1 = 625.88$$

$$\sum Y_2 = 629.78$$

$$\sum Y = 1255.66$$

SUMA ANALISTA-DIA

Yij

$$\sum Y_{11} = 311.28$$

$$\sum Y_{12} = 314.60$$

$$\sum Y_{21} = 314.02$$

$$\sum Y_{22} = 315.76$$

DONDE : r = número de replicaciones
d = número de días
a = número de analistas

Suma de cuadrados del analista (SCa):

$$SCa = \frac{(\sum Y_1)^2}{d \times r} - \frac{(\sum Y)^2}{d \times r \times a} = 1.2675$$

Suma de cuadrados del día por analista (SCd):

$$SCd = \frac{\sum Y_{ij}^2}{r} - \frac{(\sum Y_1)^2 + (\sum Y_2)^2}{r \times d} = 2.3417$$

Suma de cuadrados del error (SCe):

$$SCe = (\sum \sum Y_{ijk}^2) - \frac{\sum Y_{ij}^2}{r} = 4.0113$$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS (MC)	F CONCLUSION
Analista	$a = 2$	1.2675	$SCa/g1 = 0.6338$	$MCa/MCe = 1.2641$
Día	$(d - 1)a = 2$	2.3417	$SCd/g1 = 1.1709$	$MCD/MCe = 2.3353$
Error	$(n - 1)ad = 8$	4.0113	$SCE/g1 = 0.5014$	

H_0 : Si F calculada $\leq F$ tablas, se acepta la hipótesis

	Analista	Día
F calculada	1.2641	2.3353
F tablas	4.46	4.46

∴ El método es reproducible respecto a los analistas y respecto a los días.

TABLA NO.12 EXACTITUD DEL METODO

% DE CONCENTRACION USADA	mg DE PSEUDOFEDRINA SULFATO AGREGADOS	% RECUPERADO
60	0.4502	100.47
80	0.6003	101.15
100	0.7504*	100.73
120	0.9005	101.05
140	1.0506	100.47

$$\bar{x} = 100.77$$

$$D.E.R. = 0.32 \%$$

* Concentracion usada en el procedimiento.

TABLA NO. 13 EXACTITUD DEL METODO

% DE CONCENTRACION USADA	mg DE PSEUDDEFEDRINA SULFATO AGREGADOS	mg RECUPERADOS
60	0.4502	0.4523
80	0.6003	0.6072
100	0.7504*	0.7559
120	0.9005	0.9100
140	1.0506	1.0555

* Concentracion usada en el procedimiento.

La ecuacion de la linea recta es :

$$Y = Ax + B$$

Donde "Y" son los mg de Pseudoefedrina Sulfato recuperados
y "x" son los mg de Pseudoefedrina Sulfato agregados.

Por analisis de minimos cuadrados :

$$A = 1.0055$$

$$B = 0.0017$$

$$r = 0.9999$$

TABLA NO.14 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

MUESTRA A T.A.	ANALISIS INICIAL (%)	3 DIAS DESPUES (%)	5 DIAS DESPUES (%)
01	105.07	103.69	104.78
2	105.22	104.01	105.45
3	104.31	105.75	106.41
4	106.24	104.31	102.24
5	104.92	104.49	101.79
6	104.60	103.06	102.86
X =	105.06	104.22	103.92
D.E.R. =	0.63	0.87	1.81

CONCLUSIONES

"Allí está nuestro resultado y fue un análisis muy pequeño de un trabajo bien ejecutado"

A.C. Doyle

4. CONCLUSIONES

El método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución desarrollado para cuantificar sulfato de pseudoefedrina en solución oral, resultó ser específico; tolerante, al variar los parámetros cromatográficos dentro de ciertos límites; siendo el tiempo de corrida de aproximadamente 10 minutos.

Además, se comprobó que esta técnica es lineal, precisa y exacta dentro del intervalo estudiado. No se encontró diferencia en los resultados obtenidos inter día ni interanalista. Adicionalmente, las muestras resultaron ser estables en un periodo de tiempo razonable para ser analizadas, hasta 5 días después de haber sido preparadas y dejadas listas para ser inyectadas.

En base a los resultados antes mencionados, se encontró que el método analítico desarrollado puede ser aplicado tanto para el control de calidad del producto terminado, como para estudiar la estabilidad del mismo.

BIBLIOGRAFIA

"Conoces mis métodos. Aplicalos y será
instructivo que compares los resultados"

A.C. Doyle

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

5. BIBLIOGRAFIA

1. Walter Modell Editor. Drugs of choice. The C.V. Mosby Company USA. 1979.
2. Farmacia Práctica de Remington. Union tipográfica hispanoamericana. México 1953.
3. Clarke, E.G.C. Isolation and identification of drugs. The pharmaceutical Press. London 1969.
4. Knoll A.G. Compendium. Chemische Fabriken. 1972.
5. The United States Dispensatory. 27th ed. Deol-Pratt. USA 1973.
6. Extra Pharmacopoeia 25 ed. Martindale. The pharmaceutical Press. London 1967.
7. Burger, Alfred. Medicinal Chemistry. Wiley-Interscience 3 ed. USA 1970.
8. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. Quinta edición. México 1988.
9. Higuchi, T. Pharmaceutical Analysis. Interscience Publishers. USA 1961.
10. Bentley and Driver's textbook of pharmaceutical chemistry. Medical Oxford Publications. 8 ed. London 1969.
11. Sadeé Wolfgang; Beelem. Drug level monitoring. Wiley & sons. USA 1980.
12. The United States Pharmacopeia. XX ed. USA 1980.

13. A textbook of Pharmaceutical Analysis. Second ed. Wiley interscience publication. USA 1975.
14. Hidalgo y Mondragon Ma. del Consuelo. Farmacia química. Ed. Alhambra. España 1969.
15. W.C. Cutting. Manual de farmacología. Acción y uso de los medicamentos. Ed. Montener y Simon. Barcelona 1966.
16. Diccionario terminológico de ciencias medicas. Undecima ed. Salvat editores. México 1978.
17. Helman José. Farmacotecnia teorica y práctica. Cía. editorial continental. México 1982.
18. Hanlon, Joseph. Handbook of package engineering. Mc Graw Hill. USA 1971.
19. Lachman Leon, Lieberman. The theory and practice of industrial pharmacy. Lea & Febiger. 2 ed. USA 1976.
20. Browning, D.P. Cromatografía. Toray-Masson. España 1971.
21. Snyder, L.R. Introduction to modern liquid chromatography. Wiley interscience. 2 ed. USA 1979.
22. Yost R.W; Ettre L. Practical Liquid Chromatography. Perkin Elmer. USA 1980.
23. Skoog, D; West. Análisis instrumental. Ed. interamericana. 2 ed México 1980.
24. Dabrio, Banuls M. Cromatografía de gases II. Ed. Alhambra. Madrid 1973.

25. Waters Associates. Operator's manual. USA 1982.
26. Done, J.; Knoll, J.; Loheac, J. Applications of High Speed Liquid Chromatography. Wiley & sons. Gran Bretaña 1974.
27. Fritz, Schenkates Pharmacopeia. Química analítica cuantitativa. Ed. Limusa. 3 ed. Mexico 1979.
28. Eileen Debesis, Sheridan J.; Submitting HPLC methods to the compendia and regulatory agencies. Pharmaceutical technology, Sept. 1982.
29. Stimuli to the revision process. Report of the FMA Quality Control Section Committee on Pressurized Liquid Chromatography.
30. Statistical Evaluation of Quality Control Tests. Lee Martin; Taylor M. Pharmaceutical technology, Sept. 1988.