

35
2aj



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

OPTIMIZACION Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
PARA LA CUANTIFICACION DE GUAIFENESINA,
CLORHIDRATO DE PSEUDOEFEDRINA Y BROMHIDRATO
DE DEXTROMETORFAN, EN CAPSULAS, POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION (H. P. L. C.)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
NORA GUZMAN JUAREZ

Director de Tesis: Q. F. B. José Antonio Garduño Rosas
Coasesor de Tesis: Q. F. B. Pablo Martín Herrera Mondragón

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
1.0 OBJETIVOS	4
2.0 MARCO TEORICO	5
2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS ..	5
2.1.1 Clorhidrato de pseudoefedrina	5
2.1.2 Bromhidrato de dextrometorfán	9
2.1.3 Guaifenesina	12
2.2 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFIA	15
2.2.1 Principales parámetros cromatográficos	17
2.2.2 Teorías cromatográficas de elución	24
2.2.3 Fuerzas cromatográficas de retención	30
2.2.4 Cromatografía fase ligada	31
2.3 OPTIMIZACION DE METODOS HPLC	36
2.4 ANALISIS CUANTITATIVO POR HPLC	38
2.5 VALIDACION DE METODOS HPLC	44
3.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL	48
3.1 MATERIAL Y EQUIPO	48
3.2 OPTIMIZACION	49
3.2.1 Procedimiento de optimización	49
3.2.2 Discusión	50
3.3 VALIDACION	64
3.3.1 Procedimiento de validación	64
3.3.2 Resultados y discusión	66
4.0 CONCLUSIONES	86
5.0 ANEXOS	87
6.0 REFERENCIAS	117

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura molecular del clorhidrato de pseudoefedrina .	6
Fig. 2. Espectro U.V. del clorhidrato de pseudoefedrina en metanol	6
Fig. 3. Estructura molecular del bromhidrato de dextrometorfán .	9
Fig. 4. Espectro U.V. del bromhidrato de dextrometorfán en metanol	10
Fig. 5. Estructura molecular de la guaifenesina	13
Fig. 6. Espectro U.V. de la guaifenesina en metanol	13
Fig. 7. Cromatograma típico	18
Fig. 8. Separación de una muestra con tres resoluciones diferentes	22
Fig. 9. Representación de un pico asimétrico y las zonas de medición de asimetría	23
Fig. 10. Procesos de ensanchamiento de banda intracolumnar	29
Fig. 11. Gráfico de Van Deemter para una columna hipotética ..	29
Fig. 12. Guía típica de selección de columna y fase móvil	39
Fig. 13. Cromatograma obtenido con el método inicial	51
Fig. 14. Cromatograma obtenido al disminuir volumen de inyección	53
Fig. 15. Cromatograma obtenido con la variación de la longitud de onda	54
Fig. 16. Cromatograma obtenido por el aumento de la proporción de dietilamina	56

Fig. 17. Cromatograma obtenido al aumentar la proporción de agua	57
Fig. 18. Cromatograma obtenido al aplicar al método todas las modificaciones propuestas	60
Fig. 19. Cromatograma obtenido aplicando el método optimizado..	63
Fig. 20. Diagrama de flujo de las condiciones de operación ...	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Condiciones de análisis para el clorhidrato de pseudoefedrina por HPLC	8
Tabla 2.	Condiciones de análisis para el bromhidrato de dextrometorfán por HPLC	11
Tabla 3.	Condiciones de análisis para la guaifenesina por HPLC	14
Tabla 4.	Resultados obtenidos con el método primario	52
Tabla 5.	Resultados obtenidos al aumentar la concentración de dietilamina	55
Tabla 6.	Resultados obtenidos al disminuir la concentración de dietilamina	56
Tabla 7.	Resultados obtenidos aplicando al método todas las modificaciones propuestas	59
Tabla 8.	Resultados de coeficientes de variación y correlación	59
Tabla 9.	Características generales de algunas sustancias propuestas para ser utilizadas como estándar interno.	62
Tabla 10.	Resultados del método optimizado	63
Tabla 11.	Resultados para la determinación de la linealidad del sistema de guaifenesina	67
Tabla 12.	Resultados para la determinación de la linealidad del sistema del clorhidrato de pseudoefedrina	67
Tabla 13.	Resultados para la determinación de la linealidad del sistema del bromhidrato de dextrometorfán	68

Tabla 14. Parámetros de regresión, correlación, pendiente y ordenada al origen para la linealidad del sistema	68
Tabla 15. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del sistema de guaifenesina	69
Tabla 16. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del sistema del clorhidrato de pseudoefedrina	70
Tabla 17. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del sistema del bromhidrato de dextrometorfán	70
Tabla 18. Resultados del tratamiento estadístico para la determinación del intercepto para guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán	71
Tabla 19. Resultados para la determinación de la linealidad del método para guaifenesina	72
Tabla 20. Resultados para la determinación de la linealidad del método para clorhidrato de pseudoefedrina.....	73
Tabla 21. Resultados para la determinación de la linealidad del método para bromhidrato de dextrometorfán.....	73
Tabla 22. Parámetros de regresión , correlación, pendiente, y ordenada al origen para linealidad del método ...	73
Tabla 23. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del método para guaifenesina	74
Tabla 24. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del método para clorhidrato de pseudoefedrina	74

Tabla 25. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del método para bromhidrato de dextrometorfán	75
Tabla 26. Resultados del tratamiento estadístico para la determinación del intercepto para guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán	75
Tabla 27. Porcentajes de recobro para la determinación de la precisión y exactitud del método	77
Tabla 28. Datos obtenidos del tratamiento estadístico para la determinación de la exactitud del método	77
Tabla 29. Resultados para la determinación de la precisión del método	78
Tabla 30. Porcentajes de recobro de guaifenesina para dos días diferentes a 3 niveles de concentración ..	79
Tabla 31. Porcentajes de recobro del clorhidrato de pseudoefedrina para dos días diferentes a 3 niveles de concentración	79
Tabla 32. Porcentajes de recobro del bromhidrato de dextrometorfán para dos días diferentes a 3 niveles de concentración	80
Tabla 33. Resultados obtenidos del tratamiento estadístico efectuado para conocer la repetibilidad del método..	81
Tabla 34. Porcentajes de recobro de guaifenesina de los dos analistas, en dos días diferentes a 3 niveles de concentración	82

Tabla 35. Porcentajes de recobro del clorhidrato de pseudoefedrina de los dos analistas, en dos días diferentes a 3 niveles de concentración	82
Tabla 36. Porcentajes de recobro del bromhidrato de dextrometorfán de los dos analistas, en dos días diferentes, a 3 niveles de concentración	83
Tabla 37. Análisis de variancia para la determinación de reproducibilidad entre analistas en el ensayo de guaifenesina, a tres niveles de concentración	84
Tabla 38. Análisis de variancia para la determinación de reproducibilidad entre analistas en el ensayo de clorhidrato de pseudoefedrina, a tres niveles de concentración	84
Tabla 39. Análisis de variancia para la determinación de reproducibilidad entre analistas en el ensayo de bromhidrato de dextrometorfán, a tres niveles de concentración	85
Tabla. 40 Datos de Guaifenesina para la linealidad del método.	105
Tabla. 41 Datos de clorhidrato de pseudoefedrina para la linealidad del método	106
Tabla. 42 Datos de bromhidrato de dextrometorfán para la linealidad del método	107
Tabla. 44 Datos de guaifenesina para precisión y exactitud ...	108
Tabla. 45 Datos de clorhidrato de pseudoefedrina para precisión y exactitud	109
Tabla 46. Datos de bromhidrato de dextrometorfán para precisión y exactitud	110
Tabla 47. Datos de guaifenesina para repetibilidad	111

Tabla 48. Datos del clorhidrato de pseudoefedrina para repetibilidad	112
Tabla 49. Datos del bromhidrato de dextrometorfán para repetibilidad	113
Tabla 50. Datos de guaifenesina reproducibilidad entre analistas	114
Tabla 51. Datos para clorhidrato de pseudoefedrina para reproducibilidad entre analistas	115
Tabla 52. Datos del bromhidrato de dextrometorfán para reproducibilidad entre analistas	116

A B R E V I A T U R A S .

AS _{10%}	Asimetría del pico cromatográfico tomada al 10% de su altura.
CLL	Cromatografía de líquido - líquido.
CLS	Cromatografía de líquido - sólido.
C.V.	Coefficiente de variación.
DBr	Bromhidrato de dextrometorfán.
Fig.	Figura.
gl	Grados de libertad.
Gu	Guaifenesina.
HEPT	Altura equivalente del plato teórico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
k'	Factor de capacidad.
liq.	Líquido.
N	Número de platos teóricos.
n.m.	Nanometros.
MC	Media de cuadrados.
PHCL	Clorhidrato de Pseudoefedrina.
p.f.	Punto de fusión.
PM	Peso molecular.
ref.	Referencia.
Rs	Resolución.
SC	Suma de cuadrados.
t _m	Tiempo de retención.
α	Factor de separación.
P. activo.	Principio activo.
G.R.	Grado reactivo.
conc.	Concentración.

I N T R O D U C C I O N .

La industria farmacéutica, al elaborar medicamentos, está comprometida a obtener productos eficaces que cumplan con rigurosas normas de calidad y diversas condiciones requeridas por la ley, con el objetivo fundamental de asegurar la salud y así prevenir, aliviar y curar enfermedades⁽¹⁾. Para cumplir con este compromiso debe contar con procedimientos de fabricación y métodos de análisis óptimos.

Los métodos de análisis forman parte esencial del aseguramiento de la calidad de los productos; por eso, es necesario optimizar y adecuar los métodos analíticos a las necesidades de cada laboratorio en particular. El avance tecnológico ha jugado un papel muy importante en esta tarea, proporcionando gran diversidad en la instrumentación analítica y favoreciendo, a su vez, el desarrollo de técnicas altamente específicas, sensibles y confiables para, con esto, mejorar la calidad de los productos finales y obtener un alto grado de seguridad para el paciente⁽²⁾.

Los métodos analíticos en los que se utilizan técnicas cromatográficas, principalmente la cromatografía líquida de alta resolución-fase reversa, han tenido en años recientes una mayor aplicación, debido a que la mayor parte de las muestras son soluciones acuosas de muy diverso origen -- medicamentos, fluidos biológicos, productos naturales --, que incluyen fármacos, metabolitos y/o productos de degradación. Dichas sustancias suelen ser complejas, termolábiles, no volátiles y pueden estar en muy bajas concentraciones, por lo que constituyen muestras

difíciles de analizar⁽²⁾. La cromatografía líquida de alta resolución ha demostrado ser una técnica simple y confiable, cuyo costo de análisis es competitivo con el de otros métodos analíticos⁽³⁾.

Para determinar la confiabilidad de los resultados de cualquier método analítico, es necesario realizar la validación del mismo. Los datos obtenidos de la validación proporcionan una base para tomar decisiones correctas (aceptación o rechazo) acerca de un producto determinado⁽⁴⁾. Así pues, la validación de métodos analíticos tiene gran importancia en la industria farmacéutica, a tal grado, que la Ley General de Salud menciona que el control aplicado a cualquier preparado farmacéutico debe comprobarse y debe ser válida cualquier técnica empleada para ese fin. Con esta regulación, el Sector Salud y las autoridades sanitarias exigen la validación de los métodos analíticos⁽⁵⁾.

Los parámetros a estudiar en una validación dependen, usualmente, de las aplicaciones específicas del método⁽⁶⁾.

Dada la importancia que tiene para la industria farmacéutica contar con métodos analíticos confiables, este trabajo se enfocó, en primera instancia, a la optimización de un método analítico para la cuantificación simultánea de guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán por cromatografía de líquidos de alta resolución en cápsulas comerciales; posteriormente, al obtener el método optimizado se realizó su validación.

Este trabajo se dividió en dos partes. En la primera (marco teórico), se exponen conceptos generales importantes para la comprensión del estudio realizado y, en la segunda parte (desarrollo experimental), se presentan los procedimientos de optimización y validación por separado con sus respectivos análisis de resultados para, finalmente, concluir conjuntamente con base en los objetivos propuestos.

1.0 O B J E T I V O S.

- 1.1 Optimizar un método de análisis para cuantificar, mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución, tres principios activos: clorhidrato de pseudoefedrina, guaifenesina y bromhidrato de dextrometorfán, contenidos en cápsulas comerciales.
- 1.2 Identificar las variables que afectan el desarrollo del método por optimizar.
- 1.3 Realizar la validación del método optimizado.
- 1.4 Estimar el grado de confiabilidad mediante la validación del método.
- 1.5 Determinar las ventajas que tiene el método optimizado sobre el método primario.

2.0 MARCO TEORICO.

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.

2.1.1 Clorhidrato de pseudoefedrina.

El clorhidrato de pseudoefedrina es un estereoisómero de la efedrina⁽¹⁾, con similar actividad farmacológica pero de menor potencia. La efedrina existe en forma natural en varias plantas, fue preparada sintéticamente en 1827 y desde entonces se ha usado para el tratamiento de varios estados patológicos en los que se necesitan las acciones periféricas o centrales de los fármacos simpatomiméticos⁽²⁾.

2.1.1.1 Propiedades fisicoquímicas^(3,4,5).

Alcohol (+)-treo-[1-(metilamino)-etil]-bencil clorhidrato. $C_{10}H_{13}NO.HCl$ (Fig. 1). El clorhidrato de pseudoefedrina se presenta en forma de cristales blancos; tiene olor débil. Su peso molecular es de 201.72; p.f. 182-185 °C; rotación específica $[\alpha]_D^{20}$ en agua es de +61 a +62.5°. Muy soluble en agua (2 g/ml); soluble en etanol (0.278 g/ml), en cloroformo (0.011 g/ml); prácticamente insoluble en éter (1.4×10^{-4} g/ml).

El espectro ultravioleta del clorhidrato de pseudoefedrina en metanol exhibe bandas de máxima absorción a 251, 257 y 263 nm (Fig.2). El coeficiente de partición de la pseudoefedrina HCl a 25°C en n-octanol/agua a pH 1.2 y en n-octanol/agua a pH 6 es de 0.010 y 0.049 respectivamente. Su pKa (N-H) es de 9.8⁽⁶⁾.

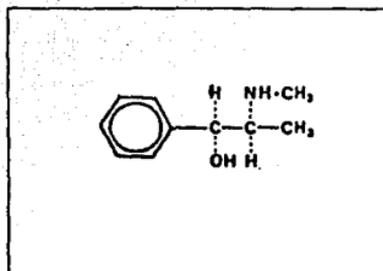


Fig. 1. Estructura molecular del clorhidrato de pseudoefedrina.

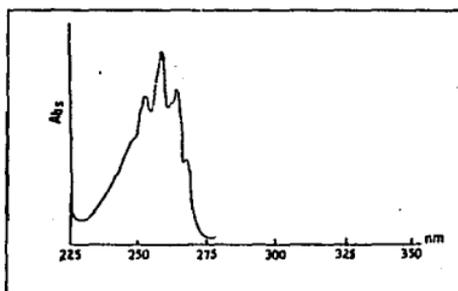


Fig. 2. Espectro ultravioleta del clorhidrato de pseudoefedrina en metanol (G.R.).

El clorhidrato de pseudoefedrina puede considerarse como un compuesto estable, ya que después de 4 semanas bajo fluorescencia y luz ultravioleta no se observa cambio en coloración o degradación

química. El fármaco en granel es estable por lo menos 6 meses a 37°C y 3 meses a 50°C. En formulaciones de tabletas y jarabes almacenados a 15-30°C por 5 años no se aprecia degradación considerable(7).

2.1.1.2 Propiedades farmacológicas(8,11).

El clorhidrato de pseudoefedrina es un agente simpatomimético con efectos directos e indirectos en receptores adrenérgicos. Su acción farmacológica es la relajación de la musculatura bronquial mediante la estimulación de los receptores alfa y beta. Su acción periférica se debe a la liberación de noradrenalina.

2.1.1.3 Métodos de análisis(7,9,12).

Existen diferentes métodos de análisis para el clorhidrato de pseudoefedrina. Entre ellos se encuentran: titulaciones no acuosas, análisis espectrofotométricos, análisis colorimétricos y cromatográficos (capa fina, gases, líquidos y en papel).

En cuanto a la cromatografía líquida de alta resolución, se han utilizado, para analizar el clorhidrato de pseudoefedrina en formas farmacéuticas o como materia prima, los sistemas con las condiciones que se mencionan en la Tabla 1.

Columna	Fase móvil	t _m (min)	ref.
Corasil [®] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	0.1% carbonato de amonio: acetonitrilo (1:9) pH=8.9	1.9	9
Corasil [®] /fenil (Waters Assoc.)		1.8	
Corasil [®] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	0.1% carbonato de amonio: acetonitrilo (4:6) soln. pH=7.4	2.1	
Corasil [®] /fenil (Waters Assoc.)		2.2	
Zimpax [®] /SCR (DuPont)	0.02M fosfato de amonio dibásico: dioxano (64:36)	7.0	
μ/Bondapak [®] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	acetonitrilo: agua: ácido acético (40:60:1) con 0.05 N KNO ₃ y 0.01 N de ác. octanosulfónico	---	13
Nucleosil [®] / silicagel (ALLtech)	metanol: ác. fosfórico: fosfato dihidrogenado de sodio (195:2:50)	6.0	9
Spherisorb [®] / silicagel (E. Merck)	etanol: 0.4% de acetato de amonio (85:15)	8.0	9
μ/Bondapak [®] /C18 (Waters Assoc.)	metanol: agua: ác. acético glacial con 0.005 M de ác. octanosulfónico	9.4	14
Spherosil [®] /CN (Beckman)	metanol: agua: dietilamina 0.03 M pH=2.5 (179:20:1)	4.01	*

* ver anexo 1.

Tabla 1. Diferentes condiciones de análisis para clorhidrato de pseudoefedrina por HPLC.

2.1.2 Bromhidrato de dextrometorfán.

El bromhidrato de dextrometorfán es un derivado sintético no opiáceo, no narcótico e isómero del análogo codeínico del levorfanol. Sin embargo, a diferencia del L-isómero, no es analgésico ni tiene riesgo de adicción. Se usa como agente antitusivo (1,2).

2.1.2.1 Propiedades fisicoquímicas (7,10,11).

Bromhidrato de 3-metoxi-17-metil-morfinan. $C_{18}H_{25}NO \cdot HBr \cdot H_2O$, (Fig.3). El bromhidrato de dextrometorfán se presenta como cristales blancos o polvo cristalino que posee olor débil. Peso molecular 370.3; p.f. 122-124°C; rotación específica $[\alpha]_D^{20} +27.6^\circ$ (c=1.5 en agua). Soluble en agua 1.5% a 25°C, 5% a 50°C y 25% a 85°C; libremente soluble en alcohol y cloroformo.

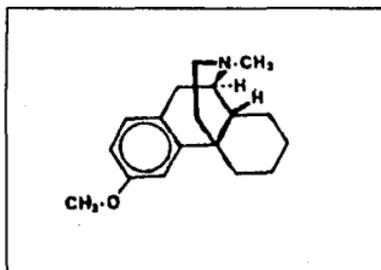


Fig.3. Estructura molecular del bromhidrato de dextrometorfán.

El espectro ultravioleta de una solución de bromhidrato de dextrometorfán en metanol, exhibe un máximo únicamente a 278nm. (Fig.4). Su coeficiente de partición octanol/agua es 3.7; pka=8.3. La estabilidad del bromhidrato de dextrometorfán, en soluciones acuosas a pH 4-5.6 es muy alta.

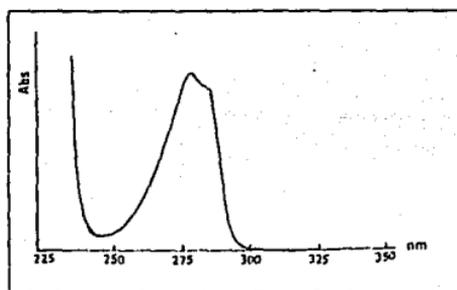


Fig. 4. Espectro ultravioleta del bromhidrato de dextrometorfán en metanol (G.R.).

2.1.2.2 Propiedades farmacológicas^(6,11).

Su acción farmacológica es central. Eleva el umbral de la tos al actuar sobre el centro de ésta en el bulbo y suprimir la rama eferente de la respuesta. Su eficiencia en pacientes con tos patológica muestra ser, en estudios controlados, aproximadamente igual a la de la codeína. Al contrario de la codeína, pocas veces produce somnolencia o trastornos gastrointestinales. En dosis terapéuticas no inhibe la actividad ciliar; a dosis muy altas puede causar depresión del sistema nervioso central.

2.1.2.3 Métodos de análisis^(7,12).

Entre los métodos de análisis para el bromhidrato de dextrometorfán, se cuentan ensayos espectrofotométricos, valoraciones potenciométricas, métodos colorimétricos y cromatográficos (capa fina, gases, líquida). En la tabla 2 se muestran algunas de las condiciones que han sido utilizadas para la determinación del bromhidrato de dextrometorfán por HPLC.

Columna	Fase móvil	t _R (min)	ref.
Bondapak [®] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	55% metanol/agua con 1% de ácido acético y 0.005 M de sulfonato de pentano	6.5	12
Bondapak [®] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	cianopropil: agua con 0.1 M de carbonato de amonio	---	
Zorbax [®] /CN (DuPont)	agua: acetonitrilo (1:1) ácido fórmico, ácido metanosulfónico pH= 3.5	6.5	16
μ/Bondapak [®] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	acetonitrilo: ácido acético agua (40:1:60) con 0.001 N de ácido octanosulfónico de sodio y 0.05 N KNO ₃	---	13
Zorbax [®] /fenil (DuPont)	acetonitrilo: 0.1 M de dihidrogenofosfato de potasio (45:55) pH= 4.0	---	15
Ciano [®] (IBM instruments)	0.05 M de nitrato de potasio en acetonitrilo: agua (25:75) pH= 3.0	9.0	17
μ-Bondapak [®] / fenil (Waters Assoc.)	buffer acuoso pH 4.1 1% de buffer de amonio y 40% de metanol	11	18
Spherosil [®] /CN (Beckman)	metanol: agua: dietilamina 0.03 M pH=2.5 (179:20:1)	4.96	*

* ver anexo 1.

Tabla 2. Diferentes condiciones de análisis para bromhidrato de dextrometorfán por HPLC.

2.1.3 Guaifenesina.

La guaifenesina aumenta el flujo de las vías respiratorias y es más efectivo que el cloruro de amonio o que el hidrato de terpina en el tratamiento de tos tuberculosa, pero en el tratamiento de asma bronquial es menos efectivo que los yoduros⁽¹⁴⁾.

Además de ser usada para muchas preparaciones farmacéuticas la guaifenesina ha sido muy aceptada como expectorante en anestesiología para equinos, por su despreciable efecto en la función respiratoria, cardíaca y parámetros hematológicos⁽²⁰⁾.

2.1.3.1 Propiedades fisicoquímicas^(7,20).

Guaifenesina o guayacolato de glicerol; $C_{10}H_{14}O_4$ (Fig. 5) . La guaifenesina se presenta como pequeños prismas rómbicos cuando son sintetizados en éter; poseen débil olor característico y sabor ligeramente amargo; p.f. 78.5-79°C; peso molecular 198.21. Muy soluble en agua caliente; libremente soluble en etanol; soluble en cloroformo, glicerol y propilenglicol; insoluble en éter de petróleo.

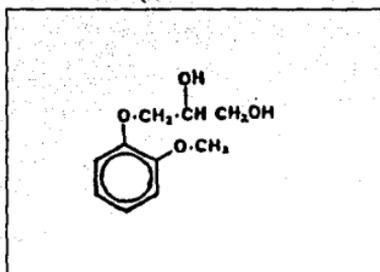


Fig. 5. Estructura molecular de la guaifenesina.

Su espectro U.V. en un intervalo 225 a 350 nm, exhibe un máximo únicamente a 273 nm (Fig.6).

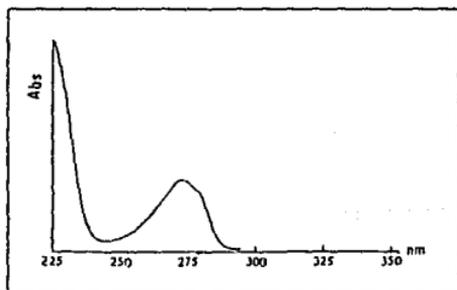


Fig. 6. Espectro ultravioleta de La guaifenesina en metanol (G.R.).

2.1.3.2. Propiedades farmacológicas^(17,21).

La guaifenesina es un expectorante. Los expectorantes favorecen la eliminación del material irritante del tracto respiratorio inferior hacia la faringe aumentando el volumen y reduciendo la viscosidad

de las secreciones respiratorias. Su modo de acción no está totalmente aclarado pero algunos expectorantes estimulan en forma refleja la secreción a través de vías vagales. Se sabe que la guaifenesina es un relajante muscular de acción central en dosis altas.

1.3.3 Métodos de análisis^(7,12).

Para la determinación de guaifenesina se cuenta con métodos colorimétricos, espectrofotométricos y cromatográficos. Los sistemas utilizados en HPLC para la determinación de guaifenesina se muestran en la Tabla 3.

Columna	Fase móvil	t _w (min)	ref.
μ/Bondapak [™] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	metanol:agua:ác.acético 1 ml ácido fórmico, ácido metanosulfónico pH= 3.5	3.8	14
μ/Bondapak [™] /C ₁₈ (Waters Assoc.)	55% metanol/agua con ácido acético y 0.005 M de sulfato pentano	3.0	12
Lichrosorb [™] / RP-8 (E.Merck)	metanol: buffer de citratos pH= 6.5 (40:60) 40% de metanol	2.8	20
Zorbax [™] /CN (DuPont)	agua:acetonitrilo (1:1) ác.fórmico, ácido metanosulfónico pH= 3.5	3.7	16
SpherosilR/CN (Beckman)	metanol: agua: dietilamina 0.03 M pH=2.5 (179:20:1)	2.62	*

* ver anexo 1.

Tabla 3. Diferentes condiciones de análisis para guaifenesina por HPLC.

2.2 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFIA.

La palabra cromatografía fue introducida por Tswett, botánico ruso quien desarrolló un proceso cromatográfico en el año de 1905. Tswett separó ciertos pigmentos vegetales, los cuales eran coloridos. Con el paso del tiempo se detectó que esta técnica no estaba restringida a sustancias coloridas, ya que también por cromatografía otros tipos de compuestos podían ser separados (1,2,3).

Así, la cromatografía está definida como un procedimiento por el que pueden ser separados los componentes de una mezcla, mediante un proceso de migración diferencial en un sistema consistente de dos fases, una de las cuales está en movimiento continuo en una dirección y en ella las sustancias individuales presentan diferentes movilidades en razón de las diferencias de fenómenos de absorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica, mientras que la otra fase se encuentra inmóvil. Por lo tanto, para efectuar la cromatografía, es fundamental el uso de una fase fija o estacionaria (usualmente un sólido granular finamente dividido), una fase móvil que puede ser un gas o un líquido y la sustancia a separar, la cual tiene que ser disuelta en un solvente apropiado o ser introducida como vapor (4).

Hasta hace aproximadamente dos décadas, la cromatografía líquida en columna se reducía básicamente a 4 métodos:

- Cromatografía de adsorción o líquido-sólido (CLS), en la cual se emplea una fase sólida estacionaria, generalmente de sílica gel o alúmina, de naturaleza polar y una fase móvil líquida no polar.
- Cromatografía de partición líquido-líquido (CLL), en la cual el soluto se distribuye entre la fase estacionaria líquida inmisible en la fase móvil y fijada mecánicamente a un soporte inerte (tierra de diatomeas, sílica gel irregular de poros grandes y baja actividad, etc.).
- Cromatografía de intercambio iónico, en la cual se usan resinas con grupos funcionales aniónicos (sulfónicos, carboxílicos) o catiónicos (amonios cuaternarios).
- Cromatografía de filtración molecular, en la cual se emplean geles (poliméricos entrecruzados, agarosa o dextranos: Sepharosa, Sephadex).

La cromatografía de partición (CLL) fue de gran importancia, sin embargo, no estaba libre de desventajas, provocadas especialmente por la débil unión de la fase estacionaria al soporte. Para evitar la pérdida de la fase estacionaria, la fase móvil debía de estar saturada de fase estacionaria, la muestra debía disolverse en esta fase móvil saturada y no podían efectuarse gradientes de elución, ni emplearse la temperatura como variable de separación. Este problema llevó al estudio de materiales alternativos, donde la fase estacionaria estuviera químicamente unida al soporte; así, se logró un aumento notable en la calidad del material de relleno. Actualmente, el método dominante es la cromatografía fase ligada que puede clasificarse en fase normal y fase reversa, de acuerdo a

La polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados al soporte. Cerca del 80% de las separaciones cromatográficas se efectúan con material de fase ligada y más del 70% corresponde a cromatografía fase reversa(22,24).

2.2.1 PRINCIPALES PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS(22,27,28).

2.2.1.1 El cromatograma.

Las curvas gaussianas que representan el número de moléculas eluidas frente al tiempo, constituyen un cromatograma (Fig.7). La forma de un pico cromatográfico indica que no todas las moléculas eluyen en el mismo tiempo exactamente. La razón reside en la consideración global de todos los fenómenos que suceden en el interior de la columna (procesos intracolumnares) y fuera de la columna (procesos extracolumnares). Los procesos intracolumnares son: la difusión de Eddy, la difusión longitudinal y la transferencia de masa fuera del equilibrio. Los procesos extracolumnares son producidos por factores instrumentales y experimentales, por ejemplo: por el volumen de inyección, las tuberías, las conexiones, el detector, etc..

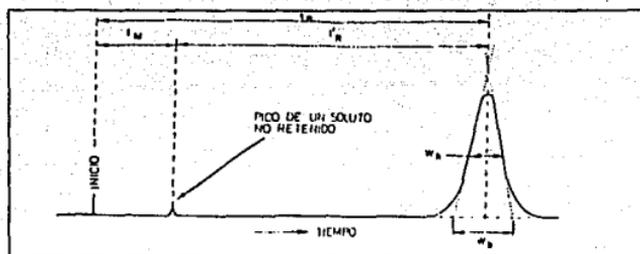


Fig. 7. Un cromatograma típico.

2.2.1.2. Tiempo de retención y tiempo de retención relativo.

Cada pico cromatográfico eluye en un tiempo dado, llamado tiempo de retención, que es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto (máxima señal). El tiempo de retención relativo (t'_R), es la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo de un soluto no retenido (t_M). El t'_R representa el tiempo que las moléculas de soluto permanecen en la fase estacionaria.

2.2.1.3 Factor de capacidad (k').

Es importante conocer cuántas veces es mayor el tiempo durante el cual el soluto permanece en la fase estacionaria, que el tiempo invertido en la fase móvil, ya que nos indica el tiempo durante el

cual puede retenerse cada componente en la columna. A esto es a lo que llamamos factor de capacidad. Este parámetro es obtenido por la relación entre el t_R' y el t_M .

$$k' = (t_R - t_M) / t_M$$

donde:

t_R = tiempo de retención.

t_M = tiempo muerto.

El k' representa el número de moléculas, que en el equilibrio, pasan a la fase estacionaria, respecto a las existentes en la fase móvil.

2.2.1.4 Factor de separación.

El factor de separación (α) describe la posición relativa de dos picos adyacentes. Para su cálculo se utilizan los factores de capacidad de cada uno de los solutos.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'}$$

donde:

k_1' = factor de capacidad del pico 1.

k_2' = factor de capacidad del pico 2.

t_{R1}' = tiempo de retención relativo del pico 1.

t_{R2}' = tiempo de retención relativo del pico 2.

Si no existe separación, entre los picos, el factor de separación es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación real.

El factor de separación se obtiene con los t_{R}' . Sin embargo, cuando se usan los modernos ordenadores de datos, generalmente se utilizan factores de separación obtenidos a partir de tiempos de retención no corregidos. Esto es aceptable solamente si los datos se utilizan en un mismo instrumento y si se comprueba que los datos son correctos mediante el análisis de muestras patrón.

2.2.1.5 Resolución.

La capacidad de una columna para separar dos solutos está definida por una magnitud denominada resolución (R_s), que es la relación entre la distancia a los centros de las zonas o máximo de los picos y el ancho de los mismos⁽²⁰⁾. La resolución se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{1/2 W_2 + W_1}$$

donde:

W_1 = ancho del pico 1 en la base.

W_2 = ancho del pico 2 en la base.

En la separación de dos picos X y Y, una resolución de 1.5 indica que la separación entre ambos picos es prácticamente completa, mientras que una resolución de 0.75 indica una pobre separación. Cuando la resolución es igual a 1, el compuesto X se encuentra traslapado con el compuesto Y aproximadamente un 4%. A una resolución de 1.5, la superposición es de aproximadamente 0.3 % (Fig. 8) (20,27).

La resolución necesaria para un determinado procedimiento está en función de los objetivos que se persigan con éste. Así, por ejemplo, en la determinación de impurezas y trazas es necesaria una resolución elevada, lo que sugiere que el requerimiento de resolución aumenta tanto como la concentración del componente menor de la mezcla disminuye (20). Cuando la tarea analítica es la determinación del contenido de activo de una forma farmacéutica, la resolución de los picos cromatográficos no es tan crítica, ya que el objetivo en la determinación cromatográfica no es obtener la separación aparentemente apropiada de los picos, sino obtener la mayor confiabilidad posible en el sistema (21,22).

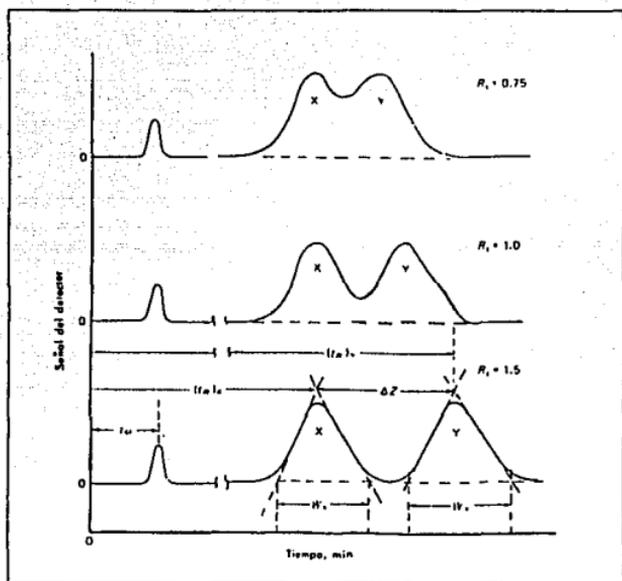


Fig. 8. Separación de una muestras con tres resoluciones diferentes (R_s).

2.2.1.6 Asimetría.

Idealmente, el pico cromatográfico tiene distribución normal (gausiana), pero existen algunos fenómenos que pueden provocar el alejamiento de esta condición. Cuando esto ocurre se dice que el pico presenta asimetría (R_s). Es muy común encontrar picos cromatográficos asimétricos por lo cual su medición es importante. La asimetría puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores

considerables de cuantificación, e incluso a sobreponer picos adyacentes. Las fórmulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As_{(10\%)} = b/a$$

$$As_{(5\%)} = b'/a'$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10% de su altura. Por su parte a' y b' son los mismos parámetros al 5% de dicha altura (Fig. 9).

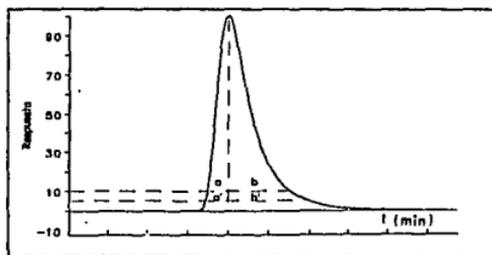


Fig.9. Representación de un pico asimétrico y las zonas de medición de asimetría.

2.2.1.7 Plato teórico y altura equivalente del plato teórico.

Un plato teórico puede considerarse como la región en que la concentración de soluto en las dos fases (móvil y estacionaria), es la misma que podría establecerse si el soluto estuviese en

equilibrio con las dos fases en esa misma región⁽²⁷⁾. Esto queda establecido por la siguiente fórmula:

$$N = 16 (t_R/W)^2$$

donde:

N = número de platos teóricos.

t_R = tiempo de retención .

W = anchura de pico en su base.

La altura equivalente del plato teórico HEPT es el grosor de cada plato y está en función de la longitud de la columna; entonces:

$$HEPT = L/N$$

donde:

L = longitud de la columna.

N = número de platos teóricos.

2.2.2. TEORIAS DE ELUCION CROMATOGRAFICA^(28,29).

Existen dos teorías que explican la velocidad a la cual migran los solutos y el ensanchamiento de la zona durante la migración. Estas teorías dan una relación cuantitativa entre la eficiencia de la columna y los parámetros experimentales.

2.2.2.1 Teoría termodinámica.

Esta teoría propuesta por Martin y Singe en 1941^(24,25) considera al sistema cromatográfico como una serie de estrechas capas horizontales y contiguas separadas, llamadas platos teóricos y en cada uno de los cuales se establece un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria bajo las siguientes suposiciones:

- a) Se establece un equilibrio real.
- b) Toda la muestra se deposita en el primer plato.
- c) Los volúmenes de las fases estacionaria y móvil son iguales en cada plato y además permanecen constantes durante el proceso.

Esta teoría es capaz de describir las velocidades de migración en forma cuantitativa, obteniéndose así, los parámetros N y $HEPT$. Estos parámetros se utilizan como una medida de la eficiencia de la columna.

Los aspectos termodinámicos son los que rigen el equilibrio de distribución o reparto de los solutos entre las dos fases y, por lo tanto, son responsables de características tan importantes como la retención y selectividad.

2.2.2.2 Teoría cinética.

La teoría cinética de la cromatografía describe con éxito los efectos de las variables que influyen en el ensanchamiento de las

bandas. Considera que los picos se ensanchan debido a tres procesos bajo control cinético (Fig. 10):

I) Difusión de flujo múltiple.

A este fenómeno se le atribuye el ensanchamiento de la zona debido a la gran cantidad de trayectorias que puede encontrar una molécula en su camino a través del empaque de una columna.

Este fenómeno conocido también como difusión de Eddy o proceso multipaso, se relaciona con el diámetro y geometría de la partícula y por una constante que depende del relleno y de la calidad de su empaquetamiento en la columna⁽²²⁾.

II) Difusión longitudinal.

Este fenómeno se debe a la tendencia de las moléculas a migrar desde la porción central concentrada de una banda, hacia las regiones más diluidas en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno del líquido. La contribución de este efecto al ensanchamiento de banda es una función inversa de la velocidad de la fase móvil y directa respecto del cociente de difusión del soluto en el solvente y de alguna constante que evalúe el espacio ocupado por la fase móvil y su geometría.

III) Transferencia de masa fuera del equilibrio.

i. Resistencia a la transferencia de masa a la fase móvil.

En el proceso real de transferencia, las moléculas del soluto que interaccionan más con la fase estacionaria, son las más cercanas a

ésta, mientras que las más alejadas demoran más tiempo para interaccionar, lo que resulta en una dispersión de la banda inicial.

La contribución de este efecto al ensanchamiento de banda será mayor cuanto mayor sea la retención del soluto. Así, será directamente proporcional a un factor dependiente de k' , a la velocidad de la fase móvil y al diámetro de partícula e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil.

ii. Resistencia a la transferencia de masa a la fase estacionaria.

Este efecto es semejante al fenómeno de resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil y es más pronunciado en CLL.

Las moléculas de soluto próximas a la superficie serán devueltas a la fase móvil más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente, lo que da lugar a un ensanchamiento de la banda.

El ensanchamiento será proporcional a una función del factor de capacidad, al espesor de la fase estacionaria en CLL o a una profundidad del poro e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria.

Se han obtenido varias ecuaciones que definen a estos tres fenómenos. La que más se utiliza es la de Van Deemter⁽²⁷⁾:

$$H_{EPT} = A + B/u + C_u.$$

donde:

A = constante asociada con la difusión de Eddy.

B = constante asociada con la difusión longitudinal.

C = constante asociada con la transferencia de masa fuera del equilibrio.

u = velocidad lineal de flujo.

La representación gráfica de estos fenómenos (fig. 11), muestra la contribución de cada término en la ecuación de Van Deemter en función de la velocidad lineal de la fase móvil, así como su efecto neto sobre HEPT.

El factor A no depende de la velocidad lineal, sino de la separación entre partículas (por ende, la calidad del empaquetamiento) y debe originar una recta paralela a las abscisas. La difusión lineal (B/u), sólo se observa a caudales muy bajos, mientras que a valores altos no debería ser perceptible. Por último, los fenómenos de resistencia a la transferencia de masa, tanto respecto a la fase móvil como a la estacionaria (C.u), se agravan a mayor velocidad lineal de la fase móvil y no se aprecian a caudal cero, ya que en este caso el tiempo para llegar al equilibrio es finito⁽²⁸⁾. La figura 11, permite aún llegar a algunas conclusiones: puede deducirse que existe una velocidad lineal (o caudal) a la cual la HEPT es mínima, es decir, la eficiencia es máxima. Caudales menores favorecen la difusión longitudinal, mientras que caudales mayores dificultan los procesos de transferencia de masa.

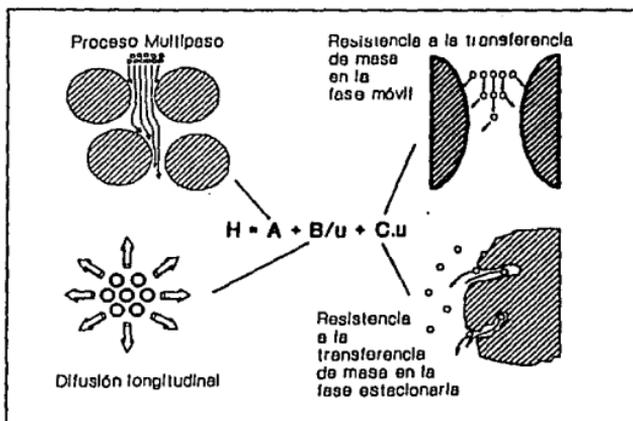


Fig. 10. Procesos de ensanchamiento de banda intracolumnar⁽²⁵⁾.

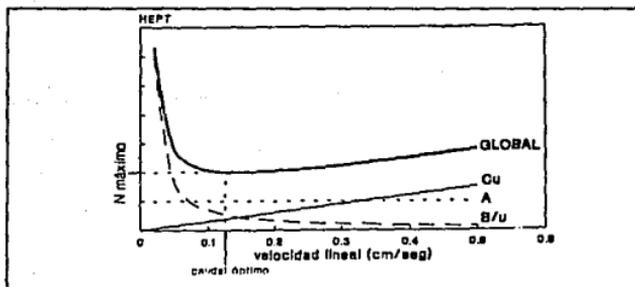


Fig. 11. Gráfico de Van Deemter para una columna hipotética. El trazado grueso corresponde a la suma de las contribuciones individuales al ensanchamiento de banda⁽²⁵⁾.

2.2.3 FUERZAS CROMATOGRÁFICAS DE RETENCIÓN (22.27.24.25.26).

Las fuerzas que experimenta un soluto, tanto en la fase estacionaria como en la fase móvil, pueden ser electrostáticas, iónicas, Van der Waals y puentes de hidrógeno, dependiendo de las características de los componentes del sistema cromatográfico.

a) Fuerzas electrostáticas.

Cuando la elución es función de la polaridad, la retención depende de la localización de las cargas de cada especie del sistema.

Las fuerzas dipolo-dipolo se presentan comúnmente cuando se utilizan solventes polares como agua, metanol, acetonitrilo, etc.. Si la molécula es un soluto polar se verá atraída por los dipolos de la fase móvil y se unirá electrostáticamente. Si un dipolo permanente es inherente a la fase móvil, cuando ésta llega a las proximidades de la molécula de soluto pueden existir interacciones de los electrones entre ambos.

b) Fuerzas de Van der Waals.

Estas fuerzas son también de naturaleza eléctrica, pero no provienen de una carga eléctrica neta o inducida. Las interacciones con este tipo de fuerza están asociadas con cadenas de hidrocarburos.

Los electrones de una molécula del soluto, por regla general, están dispuestos de modo que no generan dipolo, pero al moverse, en un momento dado se sitúan de forma que la carga efectiva ya no es

simétrica, formando un momento dipolar con el cual se llevan a cabo interacciones con el sistema cromatográfico.

c) Fuerzas iónicas.

Otra causa de fijación de moléculas, se refiere a las eventuales interacciones eléctricas entre las moléculas ionizadas de soluto con las moléculas de los solventes altamente polares. Estas interacciones se llevan a cabo con cargas eléctricas netas.

d) Puentes de hidrógeno.

También existen interacciones por establecimiento de puente de hidrógeno entre moléculas dadoras de protones yceptoras de protones. La posibilidad de que surjan enlaces puentes de hidrógeno será más considerable cuando las moléculas dadoras sean ácidos y lasceptoras sean básicas⁽²⁷⁾.

2.2.4 CROMATOGRAFIA FASE LIGADA⁽²⁸⁾.

En cromatografía fase ligada, la partícula base de silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano, octilsilano, fenilo, ciano, diol, etc.⁽²⁸⁾.

La cromatografía puede ser normal o en fase reversa dependiendo de la naturaleza del grupo funcional ligado. En algunos casos, la misma fase ligada puede ser empleada en fase normal o reversa según el tipo de fase móvil usada, por ejemplo: una fase ligada con grupo funcional ciano, al tener polaridad intermedia, funcionará en fase normal si la fase móvil es hidrófoba o como fase reversa cuando se emplean mezclas hidroalcohólicas (26,37,40).

La fase estacionaria ligada con base de sílica es obtenida, después de la modificación química de los grupos silanol de superficie, por la unión de un grupo funcional vía un puente de siloxano a la superficie de grupos hidroxilo (39). La reacción es un ataque nucleofílico del oxígeno del hidroxilo de la sílica, al átomo de silicio del silano. Este ataque se favorece por agregado de una base (piridina, imidazol) que sirve para tomar el ácido clorhídrico liberado y como catalizador por formación de un intermediario previo al siloxano (41).

Durante la silanización, la polimerización puede ser lineal o entrecruzada y el proceso es difícil de controlar. Así, algunas partículas pueden contener capas poliméricas de mayor espesor que otras; además, aproximadamente solo el 50% de la superficie de sílica potencialmente activa reacciona, principalmente por efectos estéricos. Todo esto resulta en diferencias de parámetros cromatográficos de importancia como son velocidad de transferencia de masa del soluto y capacidad de carga de la columna. Inclusive, difícilmente se consiguen lotes de calidad reproducible, por lo tanto, los grupos silanoles libres juegan un papel importante en

Los mecanismos de retención, principalmente en la cromatografía fase reversa^(2b,42).

En la determinación de trazas, se ha visto que hay cambios altamente significativos entre lote y lote de un mismo tipo de columna, por lo cual se hace necesario realizar algunas pruebas para evaluar las propiedades de las columnas (actividad silanol, actividad metálica, tamaño de poro, tiempos de retención, etc.) y determinar su efectividad⁽⁴²⁾.

2.2.4.1 Cromatografía fase reversa.

La cromatografía líquida de alta resolución fase reversa es una modalidad de las técnicas cromatográficas en columna. En ella el uso de instrumentación automatizada, detectores sensibles y selectivos, presiones elevadas, fases estacionarias no polares con partículas de diámetro pequeño, sistemas de inyección de muestras precisos, y fases móviles de gran pureza han logrado una eficiencia elevada para la separación y determinación de los componentes de una mezcla.

En este tipo de cromatografía la fase móvil está compuesta de solventes polares tales como agua, metanol, acetonitrilo, etc. y la fase estacionaria es no polar.

En la cromatografía fase reversa, dado que el material de la fase móvil es no polar, las únicas fuerzas de interacción posibles deberían ser las de Van der Waals, descartándose otros tipos de interacciones. Sin embargo, las fuerzas de Van der Waals no bastan

por sí solas para justificar la retención observada de solutos en fase reversa. Por ello se han propuesto otros modelos de retención como la teoría solvofóbica, la cual atribuye la retención a que la interacción entre moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción entre moléculas de solvente entre sí; como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria que actúa como receptor pasivo⁽⁴³⁾. Por lo tanto, puede asumirse que el grupo polar se orienta hacia la fase móvil acuosa, mientras que su porción hidrófoba lo hace hacia la superficie hidrocarbonada.

La magnitud de la interacción soluto-fase enlazada será mayor cuanto mayor sea el tamaño del grupo apolar y consecuentemente la superficie de contacto. Por el contrario, las funciones polares del soluto favorecerán la interacción con los solventes polares y reducirán la retención. Naturalmente los grupos funcionales, su posición en la molécula y su accesibilidad, influyen en la retención^(44,45). En la práctica, sin embargo, el mecanismo de retención se complica por la presencia de silanoles residuales. Así, el fenómeno de retención se debe a dos mecanismos: el silanofóbico y el silanofílico⁽⁴⁶⁾.

Las interacciones silanofílicas pueden potencialmente proveer mayor selectividad a un sistema cromatográfico que las interacciones hidrofóbicas, en los fármacos con características básicas, ya que los grupos hidroxilo no enlazados pueden formar puentes de hidrógeno. Por esto, bajo condiciones experimentales, el comportamiento cromatográfico de solutos básicos es más complejo que el comportamiento de compuestos ácidos y neutros⁽⁴⁷⁾.

Los solutos con grupos funcionales amino, exhiben frecuentemente pobre eficiencia cromatográfica. Sin embargo, ésta puede ser mejorada por la adición de agentes modificadores de la fase móvil, generalmente alquilaminas^(36,37,47).

Los modificadores amino han sido ampliamente usados en la cromatografía fase reversa para inhibir las interacciones silanofílicas y se ha supuesto un mecanismo de interacción iónica para la retención de solutos, en el cual los agentes modificadores, al tener contacto cercano con la fase estacionaria, son adsorbidos en la cadena alquílica formando una capa primaria activa.

La retención de los solutos puede ser incrementada o disminuida dependiendo de la carga del soluto y de la del ión de interacción. Por ejemplo, con modificadores cargados positivamente (como la dietilamina), una capa positiva será formada en la fase estacionaria reversa, la cual tenderá a repeleer cualquier soluto cargado similar bloqueando las interacciones puente de hidrógeno que pudieran llevarse a cabo con los silanoles libres de la matriz (los cuales tienen características ácidas)^(47,48).

Los modificadores orgánicos permiten el control de la forma de pico y t_R en compuestos básicos⁽⁴⁷⁾.

2.3 OPTIMIZACION DE METODOS HPLC.

La optimización de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución se ve reflejada en la resolución y separación de los componentes, en el mejoramiento de la forma de los picos y en la disminución del tiempo de análisis⁽⁴⁷⁾.

Para optimizar un método es necesario conocer las características fisicoquímicas de la muestra que se desea analizar, entre las que se incluyen, por ejemplo, composición química, polaridad, solubilidad, etc.. También es importante conocer métodos ya existentes para el análisis de muestras similares a las del estudio en cuestión, ya que esto nos proporciona información de su comportamiento a diferentes condiciones de análisis para poder elegir las de trabajo adecuadas, tomando en cuenta, además, el material y equipo que se tienen disponibles, la utilidad analítica que se pretende dar al método, el intervalo de concentraciones a utilizar, la sensibilidad, la selectividad, el tiempo y costo del análisis, etc.^(30,31). Se deben conocer las variables que pueden afectar al método^(35,32), por ejemplo:

- procedimiento de muestreo.
- preparación de la muestra.
- tipo de cromatografía.
- fase móvil.
- detección⁽⁴²⁾.

El primer paso en el proceso de optimización es el ajuste de parámetros cromatográficos: R_s , k' y α . (23).

La optimización se lleva a cabo mediante diferentes estrategias de retención y éstas se han clasificado en tres grupos: 1) empíricas (ensayo y error); 2) diseño estadístico (rutinas buscadas por computadora); 3) desarrollo de una teoría total de retención como función de las condiciones de separación, lo que permitirá el desarrollo de esquemas de optimización basados en la preselección de parámetros independientes (condiciones cromatográficas), para realizar la interpolación del sistema óptimo para una muestra dada (27,33,34).

Se ha encontrado que el cambio de fase estacionaria en fases alquil-ligadas para HPLC-fase reversa, no es muy significativo, debido a que dichas fases tienen propiedades de selectividad similares, aunque existen algunas diferencias debidas a la longitud de la cadena y la marca comercial (35). Por lo tanto, la variable independiente más frecuentemente empleada en la optimización de las separaciones por HPLC, es la composición de la fase móvil, por su efecto significativo en la resolución de los picos y en el factor de capacidad. Es evidente que ciertos factores asociados con componentes que están presentes en muy pequeñas cantidades en la fase móvil, tales como modificadores orgánicos, así como pH y velocidad de flujo, también influyen en las separaciones (36).

Para la primera elección de un sistema óptimo, puede ser de gran ayuda conocer y tomar en cuenta las siguientes características: peso molecular de la muestra; solubilidad; tipo de separación, basándose en la estructura molecular de los componentes a separar;

PM DE LA MUESTRA	SOLUBILIDAD DE LA MUESTRA	TIPO DE SEPARACION	FASE MOVIL TIPICA
<1000	insoluble en agua (iónico)	Liq-Liq fase normal no polar	CHCl ₃ EtOAc
		Liq-sólido adsorción polar	n-C ₆ H ₁₄ CHCl ₃
	soluble en agua (no iónico)	Liq-Liq partición fase reversa	H ₂ O/MeOH H ₂ O/CH ₃ CN
	soluble en agua (iónico)	intercambio catiónico (básico)	buffers (PO ₄ , BO ₃) pH 2-9
intercambio aniónico (ácido)		modificadores (HOAc, HNO ₃)	
>1000	soluble en agua	filtración en gel	ROH H ₂ O
	insoluble en agua	exclusión molecular	CHCl ₃ THF tolueno

Fig. 12. Guía típica de selección de columna y fase móvil (100).

La cuantificación de los picos cromatográficos generalmente se realiza midiendo su área, aunque se ha reportado una mejor precisión midiendo la altura⁽²²⁾, siempre y cuando los picos sean simétricos y las condiciones de operación se mantengan constantes. La concentración del principio activo en la muestra se puede calcular por diferentes métodos:

- a) Normalización interna.
- b) Estándar externo.
- c) Estándar interno.
- d) Estándar agregado.

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, nivel de precisión requerido y la existencia o no de sustancia de referencia⁽²²⁾.

a) Normalización interna.

El método consiste en referir el contenido de principio activo al total de áreas en el cromatograma. Para ello se suman las áreas de todos los picos presentes y el contenido se calcula como porcentaje, es decir:

$$P_i = \frac{A_i}{A_j} \times 100$$

donde: P_i es el porcentaje del componente i en la mezcla; A_i es el área del componente i y A_j es la sumatoria de todas las áreas del

cromatograma. Este método no requiere estándar de referencia y es poco usado en HPLC ya que se requiere que todos los componentes tengan el mismo factor de respuesta (fi). Es decir, que si se trabaja con un detector U.V., todas las sustancias deben tener el mismo valor de absorptividad a la longitud de onda elegida. Este caso suele darse pocas veces y habitualmente con familias de compuestos o sustancias que están muy relacionadas.

b) Estándar externo.

Este método consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al principio activo en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambos, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas.

La concentración del principio activo en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área del pico correspondiente al estándar de referencia, es decir:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_s} \times D \times 100$$

donde:

P es el porcentaje de principio activo en la muestra; A_m y A_s son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente; C_s es la concentración del estándar y D es el factor de dilución.

c) Estándar agregado.

Este método consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual, y la otra es muestra a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar de referencia.

Esta segunda muestra se utiliza como estándar. La concentración del principio activo en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_{ms} - A_m} \times D \times 100$$

donde:

P es el porcentaje de principio activo en la muestra; A_m y A_{ms} son las áreas de la muestra tal cual y la muestra a la que se le ha agregado estándar, respectivamente; C_s es la concentración del estándar y D es el factor de dilución.

Este método resulta de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja.

d) Estándar interno.

Este método consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar con la misma concentración de la muestra. El estándar interno, se adiciona a la muestra en el paso inmediato anterior al análisis^(***).

Para determinar la concentración de principio activo en la muestra se calcula la relación de áreas entre principio activo y estándar

interno, tanto en la muestra como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas, es decir:

$$P = \frac{R_m C_s}{R_s} \times D \times 100$$

donde:

P es el porcentaje de principio activo en la muestra; R_m y R_s son las relaciones de áreas de principio activo/estándar interno y estándar/estándar interno, respectivamente; C_s es la concentración del estándar y D es el factor de dilución.

El estándar interno debe cumplir algunos requisitos, como son:

- No estar presente en la muestra.
- Presentar área o altura similar a la del principio activo.
- Eluir a un valor de k' cercano al del principio activo.
- Resolverse completamente.
- Ser estable y químicamente inerte.
- Responder en forma semejante a la del principio activo con el detector seleccionado.
- Tener propiedades similares a las del principio activo.

El método de estándar interno no es sensible a los errores de inyección debido a que éstos se compensan al utilizar relaciones de áreas y, en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra, tales como: dilución, extracción y derivación.

La elección del estándar interno es, generalmente, una tarea que consume mucho tiempo, ya que se realiza la mayoría de las veces por ensayo y error usando compuestos de la serie homóloga del principio activo. Sin embargo, existen ya métodos por computadora que facilitan esta tarea⁽¹⁾.

2.5 VALIDACION DE METODOS HPLC.

La validación de un método analítico proporciona una medida de la eficiencia del mismo; por esto, después de su optimización, el método debe ser validado⁽²⁾.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos⁽³⁾.

La validación debe demostrar que el método está libre de errores sistemáticos y que detecta la sustancia que se propone detectar⁽⁴⁾. Las características de eficiencia son expresadas en términos de variables analíticas. Las variables analíticas consideradas en cualquier programa de validación son típicamente; precisión, exactitud, linealidad, especificidad, límite de cuantificación y límite de detección. Sin embargo, éstos dependen de la utilidad del método⁽⁵⁾ (ver anexo 4). Así, la validación es única para cada método⁽⁶⁾.

El primer parámetro a evaluar generalmente es la especificidad del método. La especificidad se define como la capacidad de un método analítico para determinar solamente el compuesto(s) de interés, en presencia de compuestos potencialmente interferentes. En HPLC significa que no exista otro pico con el mismo tiempo de retención que el pico del fármaco. La especificidad puede ser incorporada en uno de los pasos del trabajo desarrollado (por ejemplo, extracción selectiva, separación cromatográfica o uso de detectores específicos) o por medio de un cambio en los parámetros experimentales (cambio en la fase móvil o longitud de onda de detección)'. Esta prueba se lleva a cabo comparando resultados de el análisis de muestras que no contengan la sustancia de interés, pero sí, los demás componentes (placebo).

En HPLC usando detección ultravioleta, se puede detectar impurezas en el compuesto, debido a que aparece un pico cromatográfico distorsionado el cual no debe presentarse cuando la muestra es pura'==.=='.

La linealidad del sistema y del método son parámetros muy importantes, y se deben evaluar después de conocer la especificidad del método. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de

una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

La linealidad del método se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos adicionados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado^(*).

El tratamiento matemático es normalmente un cálculo de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de los resultados de respuesta vs concentración, y cantidad adicionada vs cantidad determinada para la linealidad del sistema y del método respectivamente^(**). La pendiente de la línea de regresión es una medida de la sensibilidad del método mientras que el intercepto es una medida de posibles interferencias en el método^(*).

La precisión y la exactitud del método son dos parámetros muy importantes que están definidos de la siguiente manera:

Exactitud.- Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia y se determina de, cuando menos, 6 placebos adicionados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista^(**).

Precisión.- Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación y se determina por el análisis sextuplicado de una solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **Repetibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio, etc.).

b) **Reproducibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.) y se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

3.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL.

La fase experimental de este trabajo se desarrolló en dos etapas:

1a. Optimización del método cromatográfico para la cuantificación simultánea de guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán.

2a. Validación del método optimizado.

3.1 MATERIAL Y EQUIPO.

3.1.1 Equipo.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hewlett Packard, modelo 1090 LC, con integrador modelo 3090 A.
- Sistema de filtración al vacío.
- Baño de ultrasonido.
- Balanza analítica.

3.1.2 Material.

- Columna cyano ultrasphere, dp 5 μm , 4.6 mm x 25 cm de longitud.
- Material de uso común en el laboratorio.
- Filtros millipore de 2 μm .

3.1.3 Reactivos.

- Metanol HPLC. (Merck).
- Agua HPLC. (Merck).

- Metanol grado reactivo -G.R.- (Merck).
- Dietilamina (Baker).
- Acido fosfórico concentrado (Merck).
- Estándar secundario de clorhidrato de pseudoefedrina.
- Estándar secundario de bromhidrato de dextrometorfán.
- Estándar secundario de guaifenesina.
- Estándar secundario de isotipendilo.
- Agua destilada.
- Excipientes.

3.2 OPTIMIZACION.

La optimización de un método por HPLC se ve reflejada en la resolución y separación de los componentes, en el mejoramiento de la forma de los picos y en la disminución del tiempo de análisis⁽¹⁴⁷⁾.

3.2.1 Procedimiento de optimización.

La optimización del método cromatográfico para la cuantificación simultánea de guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán (método primario, ver anexo 2) se llevó a cabo mediante ensayo y error, que es una de las estrategias más empleadas para lograr el ajuste de parámetros cromatográficos como son resolución, factor de separación y factor de capacidad^(27,33,54).

Al analizar los resultados obtenidos del método primario, se evaluaron las posibles variables a modificar. Tales modificaciones se efectuaron controladamente y una a la vez, de la siguiente manera:

- a) Se minimizó el volumen de inyección.
- b) Se eligieron condiciones de integración adecuadas y prácticas.
- c) Se seleccionó diferente longitud de onda.
- d) Se disminuyó la concentración de la muestra.
- e) Se hicieron variaciones en la fase móvil.
- f) Se propuso el uso de estándar interno.

3.2.2 Discusión.

Un problema inherente al método primario es la imposibilidad de cuantificar adecuadamente y de forma simultánea los principios activos contenidos en la muestra, debido a la gran diferencia del contenido de cada uno en las cápsulas. La proporción es 6.66:2:1 de guaifenesina (Gu), clorhidrato de pseudoefedrina (PHCL) y bromhidrato de dextrometorfán (DBr), respectivamente.

El cromatograma obtenido del método primario (Fig.13) mostró claramente las diferencias de concentración de los componentes de la mezcla. La guaifenesina presentó un pico no simétrico y muy ancho, debido a que su concentración en la muestra analizada es muy alta. Cuando se presentan picos con estas características es recomendable disminuir su concentración, ya que las muestras muy concentradas saturan la fase estacionaria, lo cual provoca una

deficiente resolución; el detector también es menos sensible a pequeños cambios, ya que se sobrecarga y puede presentarse el hecho de que dos o más sustancias sean detectadas como un solo pico cromatográfico⁽²²⁾. El análisis de los resultados (Tabla 4) indicó que existe separación de las sustancias presentes. Sin embargo, la resolución es mala, ya que los picos correspondientes no se resuelven en la línea base (Resolución < 1.0) y presentan asimetría.

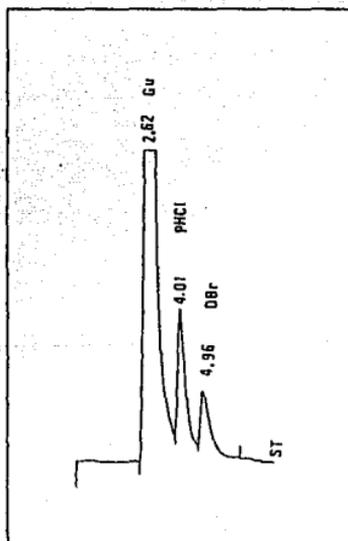


Fig. 13. Cromatograma obtenido del método inicial.

p. activo	t_R	RS(10%)	α
Gu	2.62	4.2	1.53
PHCL	4.01	2.3	
DBr	4.96	2.2	1.24

Tabla 4. Resultados obtenidos del método inicial.

Con base en los resultados anteriores, se realizó la modificación del volumen de inyección de 10 μ l a 5 μ l. La disminución del volumen de inyección no afectó el valor del factor de separación, sin embargo la asimetría disminuye de 4.2 a 3.8; de 2.3 a 2.1 y de 2.2 a 2.0 para Gu, PHCL y DBr, respectivamente. Los picos continuaron teniendo una resolución \approx 1.0 (Fig. 14). Se intentó disminuir la concentración de la muestra inicial ya que el volumen de inyección de 5 μ l, es el mínimo a inyectar, sin embargo, al disminuir la concentración de la muestra inyectada, los picos cromatográficos de las sustancias de menor proporción presentaban problemas en la precisión, debidos a la detección, por lo que se cambió la longitud de onda a la que se estaba llevando a cabo el análisis (254 nm).

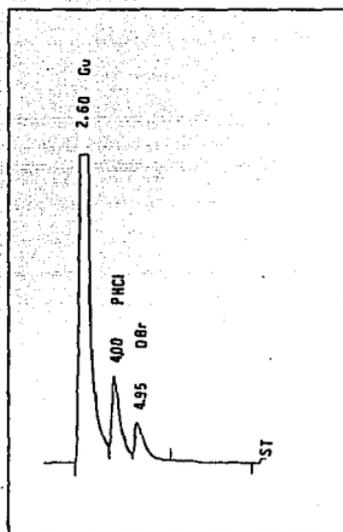


Fig. 14. Cromatograma obtenido al disminuir el volumen de inyección de 10 μ l a 5 μ l.

Por las características espectrofotométricas de las sustancias a separar, no fue posible trabajar a la longitud de onda de mayor absorción del componente de menor proporción en la formulación de las cápsulas (bromhidrato de dextrometorfán). Primero, porque a esta longitud de onda el clorhidrato de pseudoefedrina no exhibe absorción. Segundo, porque la guaifenesina (componente en mayor proporción) tiene una curva espectral similar a la del bromhidrato de dextrometorfán. Se eligió trabajar a una longitud de onda de 263nm, donde el clorhidrato de pseudoefedrina tiene un máximo de

absorbancia y el bromhidrato de dextrometorfán incrementa su absorción. Por motivos prácticos se decidió cambiar la velocidad de la carta, lo cual no afecta los parámetros cromatográficos. El cromatograma resultante (Fig.15), muestra la variación en los picos debida a la longitud de onda. La detección a 263 nm hizo posible la reducción de la concentración de la muestra inyectada a la mitad de la concentración inicial.

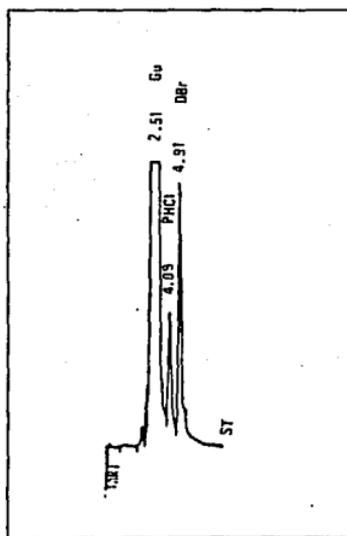


Fig. 15. Cromatograma obtenido con la variación de la longitud de onda de 254 nm a 263 nm.

La composición de la fase móvil tiene efecto significativo en la resolución de los picos y en el factor de capacidad, por esto es la principal variable a modificar para lograr la optimización de un método por HPLC, por lo cual se realizaron cambios en la fase móvil utilizada en el método primario. En esta fase en particular, se modificó la proporción de dietilamina y agua. En primer lugar, se estudió el efecto de la dietilamina en la separación y resolución de los componentes de la muestra. En la Fig. 16 se muestra el cromatograma de una muestra para la cual se aumentó la proporción de dietilamina de 0.5% a 0.6% v/v en la fase móvil. Los resultados indicaron: reducción de los factores de separación; reducción en los tiempos de retención y picos más estrechos (Tabla 5). Sin embargo, la resolución no fue buena aún ($R_s < 1.0$). Cuando se disminuyó la proporción de dietilamina a 0.3% los tiempos de retención y el factor de separación aumentaron (Tabla 6). Se realizó un ensayo eliminando la dietilamina de la fase móvil, con lo que se obtuvieron tiempos de retención del clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán elevados, causando que se tuviera un tiempo de análisis muy largo (superior a 20 minutos).

p. activo	t_R	$RS_{(10\%)}$	α
Gu	2.87	3.0	1.33 1.10
PHCL	3.63	1.5	
DBr	4.20	1.9	

Tabla 5. Resultados obtenidos al aumentar la dietilamina a 0.6 % .

p. activo	t _R	AS _{110W}	α
Gu	2.89	1.6	1.53
PHCl	4.45	1.2	1.13
DBr	5.03	1.4	

Tabla 6. Resultados obtenidos al disminuir la dietilamina a 0.3 %.

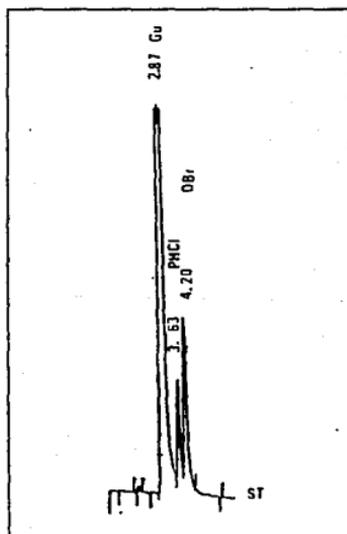


Fig. 16. Cromatograma obtenido por el aumento de la proporción de dietilamina, de 0.5% a 0.6% v/v.

Posteriormente, se estudió el efecto que tenía el agua en la separación cromatográfica. Al aumentar la proporción de agua en la fase móvil en incrementos de 1% v/v no se observaron cambios en los cromatogramas obtenidos antes de un 15% v/v, ya que cuando se alcanzó dicha proporción se apreció un ensanchamiento inadecuado de los picos (Fig.17). Al disminuir la proporción de agua en la fase móvil hasta 5% v/v no se apreció diferencia significativa; pero por debajo de esta concentración la línea base presentó deriva y ruido altos.

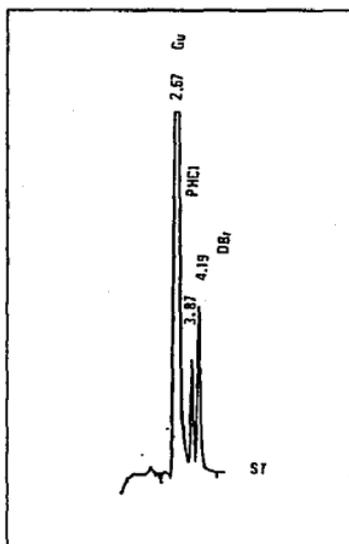


Fig. 17. Cromatograma obtenido al aumentar la proporción de agua a 15% v/v.

Con base en los ensayos anteriores se eligieron condiciones cromatográficas más favorables, las cuales se obtuvieron reduciendo la proporción de agua de 10 % a 5 % v/v y disminuyendo la proporción de dietilamina en la fase móvil de 0.5% a 0.2% v/v . Al aplicar dichas condiciones para observar si se lograban características cromatográficas adecuadas, se obtuvieron valores satisfactorios de resolución (R_s) 1.0) y de asimetría (Tabla 7 y Fig. 18). Los resultados muestran el efecto altamente significativo que tiene la concentración de modificador orgánico (dietilamina) en el tiempo de retención, la resolución, el factor de separación y la asimetría de los picos cromatográficos, encontrándose que un aumento en la dietilamina, disminuye los valores de dichos parámetros, lo cual indica una relación inversamente proporcional. Por otra parte, la concentración de agua en la fase móvil influye principalmente sobre la asimetría de los picos, obteniéndose una relación directamente proporcional, ya que al aumentar la concentración de agua, la asimetría aumenta también. Sin embargo, concentraciones muy bajas de agua o la ausencia de ésta en la fase móvil, provoca problemas de ruido y deriva en la línea base. Los resultados también muestran la importancia de la correcta elección de la longitud de onda, ya que si se cuenta con la más adecuada, puede disminuirse la concentración de la muestra para evitar la saturación del detector y la columna.

Con los cambios realizados se supuso la obtención de método óptimo, por lo cual se procedió a analizar soluciones de estándar que contenían guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán por dicho método, con el objeto de conocer el

comportamiento del sistema (linealidad y precisión). Para ello, se efectuaron 15 corridas cromatográficas (cinco niveles de concentración por triplicado). El tratamiento estadístico indicó la existencia de una dispersión de datos elevada, con resultados de coeficientes de variación y correlaciones mostrados en La Tabla 8. Al analizar los resultados obtenidos se estableció la necesidad de utilizar un estándar interno.

p. activo	t_R	AS(10%)	α
Gu	2.61	1.10	2.03 1.14
PHCL	5.32	1.03	
DBr	6.08	1.00	

Tabla 7. Resultados obtenidos aplicando al método todas las modificaciones propuestas.

p. activo	C.V.	r^2
Gu	2.89	0.947
PHCL	4.45	0.988
DBr	5.03	0.984

Tabla 8. Resultados de coeficientes de variación y correlación.

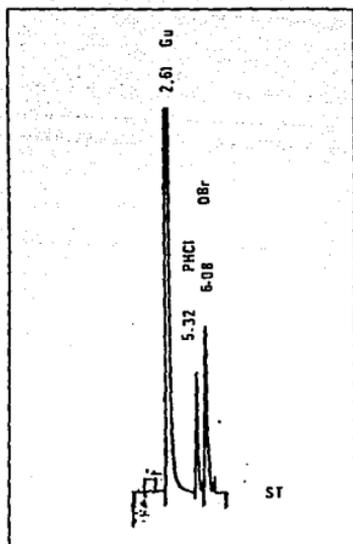


Fig. 18. Cromatograma obtenido aplicando al método todas las modificaciones propuestas

El estándar interno es a menudo utilizado como parte del método analítico para la cuantificación de un principio activo determinado. Su uso presenta las ventajas de lograr una mejor precisión y puede, a su vez, minimizar errores aleatorios⁽¹⁴⁾.

La elección del estándar interno se hizo de entre varias sustancias disponibles en el laboratorio, cuyas características fisicoquímicas son similares a las de uno ó mas de los principios activos en

estudio. Las sustancias propuestas fueron: metoclopramida, isotipendilo, maleato de clorfeniramina, doxopram y dimetoxanato. Se sometió cada una de las sustancias a análisis cromatográfico y se determinó su t_R en el sistema en cuestión (Tabla 9). Por sus características fisicoquímicas y cromatográficas se decidió que el isotipendilo era la sustancia idónea para ser usada como estándar interno.

Finalmente se realizaron análisis cromatográficos a soluciones que contenían los estándares de referencia (a diferentes niveles de concentración, tomando como 100% la concentración real) y al estándar interno (a una concentración constante), con la finalidad de probar la capacidad del sistema para resolver favorablemente a todos los componentes de la mezcla y verificar la utilidad del estándar interno como tal. Con los resultados obtenidos se determinaron las condiciones finales, con las cuales quedó establecido el método optimizado (Tabla 10 y Fig. 19). Ver Anexo 2.

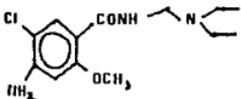
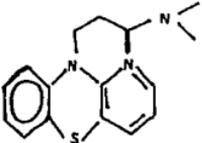
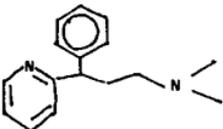
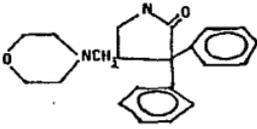
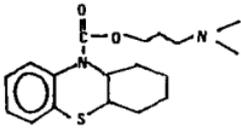
P. activo	Estructura química	Solubilidad	t _R *
Metoclopramida		soluble en agua metanol y etanol	6.58
Isotipendilo		soluble en agua y etanol.	7.10
Maleato de clorfeniramina		soluble en agua y etanol.	6.59
Doxopram		soluble en agua, ligeramente sol. en alcohol y cloroformo.	4.12
Dimetoxanato		soluble en agua y metanol.	6.71

Tabla 9. Características generales de algunas sustancias propuestas para ser utilizadas como estándar interno.

* Tiempos de retención obtenidos al someter cada uno de los p. activos al análisis cromatográfico con las condiciones finales.

p. activo	t_R	$RS_{(10\%)}$	α
Gu	2.81	1.1	1.98
PHCL	5.55	1.0	
DBr	6.44	1.0	1.16

Tabla 10. Resultados del método optimizado.

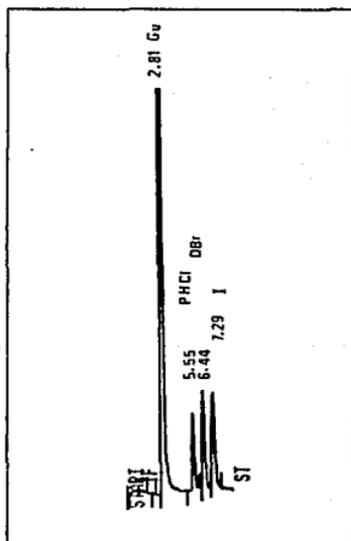


Fig. 19. Cromatograma obtenido aplicando el método optimizado.

3.3 Validación.

La validación de un método analítico proporciona una medida de la eficiencia del mismo, por lo cual, después de su optimización un método debe ser validado^(4,57).

3.3.1 Procedimiento de validación.

- Especificidad.

Para determinar la especificidad del método se analizaron en dos días diferentes seis muestras placebo, al igual que cada uno de los excipientes por separado, a un nivel de concentración de 120% .

- Linealidad del sistema.

Después del estudio de especificidad, se determinó en un día la linealidad del sistema. Se construyó una curva de calibración (concentración vs altura) con muestras preparadas a partir de una solución stock que contenía guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán y se analizaron a 5 diferentes niveles de concentración (90, 96, 100, 105, y 112%), por triplicado.

- Precisión del sistema.

La precisión del sistema se determinó mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos para la linealidad del sistema. Al conocer la relación existente entre la concentración y la respuesta obtenida, se realizó en un día la linealidad del método. Se construyó una curva de calibración (cantidad adicionada vs cantidad determinada), se utilizaron placebos adicionados con 5 concentraciones diferentes (90, 96, 100, 105 y 112%), por triplicado.

- Precisión y exactitud del método.

Estas características del método se determinaron en un día por el análisis sextuplicado de placebos adicionados, utilizando 3 niveles de concentración (90, 100 y 112%).

- Repetibilidad.

La repetibilidad entre días se realizó, además de los análisis anteriormente efectuados, el análisis quintuplicado de placebos adicionados, utilizando 3 niveles de concentración (90, 100 y 112%).

- Reproducibilidad.

Para la reproducibilidad entre analistas se analizaron en dos días diferentes muestras de placebo adicionado por un 2o. analista, bajo el siguiente esquema:

- 2o. analista, 1er. día.

Se efectuó el análisis a muestras de placebos adicionados, por duplicado a 5 niveles de concentración diferentes (90, 96, 100, 105 y 112%).

- 2o. analista, 2o. día.

El análisis se le realizó a 5 muestras de placebos adicionados con 5 niveles de concentración (90, 96, 100, 105 y 112%).

3.3.2 Resultados y discusión.

- Especificidad.

Los placebos sometidos al análisis cromatográfico, con la finalidad de conocer la especificidad del método optimizado, no presentaron respuesta, quedando establecido que la respuesta obtenida fue debida únicamente a los principios activos (Gu, PHCl y DBr).

- Linealidad del sistema

Para conocer la relación que existe entre la respuesta (cociente entre la altura del pico cromatográfico de la muestra y la altura del pico cromatográfico del estándar interno) y la concentración, se llevaron a cabo diferentes tratamientos estadísticos (ver anexo 3). Los datos sometidos a este tratamiento fueron los que se obtuvieron en los ensayos realizados para conocer la linealidad del sistema (Tablas 11, 12 y 13).

Nivel de conc. (%)	Respuesta (h_m / h_{m_i})		
90	66.490	66.042	66.241
96	70.334	70.532	70.009
100	74.253	74.051	74.241
105	77.450	78.736	78.269
112	82.674	82.612	81.460

Tabla 11. Resultados para la determinación de la linealidad del sistema de guaifenesina (h_m altura del pico cromatográfico de la muestra, h_{m_i} altura del pico cromatográfico del estándar interno).

Nivel de conc. (%)	Respuesta (h_m / h_{m_i})		
90	0.929	0.938	0.935
96	1.001	0.990	1.006
100	1.031	1.041	1.043
105	1.096	1.085	1.089
112	1.190	1.185	1.186

Tabla 12. Resultados para la determinación de la linealidad del sistema del clorhidrato de pseudoefedrina.

Nivel de conc. (%)	Respuesta (h_m / h_{m1})		
90	1.638	1.633	1.637
96	1.745	1.740	1.750
100	1.821	1.832	1.828
105	1.929	1.925	1.920
112	2.072	2.069	2.065

Tabla 13. Resultados para la determinación de la linealidad del sistema del bromhidrato de dextrometorfán.

El análisis estadístico de regresión y correlación para los datos de linealidad de cada uno de los principios activos (tabla 14), indicaron la relación entre las variables es altamente significativa y que presentaban un comportamiento descrito por las siguientes ecuaciones:

$$y = 0.746x - 0.840 \text{ para guaifenesina.}$$

$$y = 0.011x - 0.090 \text{ para clorhidrato de pseudoefedrina.}$$

$$y = 0.020x - 0.144 \text{ para bromhidrato de dextrometorfán.}$$

P. activo	Parámetros			
	r	r ²	m	b
Gu	0.995	0.989	0.746	-0.840
PHCL	0.996	0.992	0.011	-0.090
DBr	0.999	0.999	0.020	-0.144

Tabla. 14. Parámetros de regresión (r), correlación (r²), pendiente (m) y ordenada al origen (b), para la linealidad del sistema.

Se realizó una prueba de hipótesis (Cuadro 1) para determinar, mediante un análisis de variancia, si la relación existente entre las dos variables (respuesta y concentración) era lineal. Este análisis se realizó para cada uno de los principios activos.

Cuadro 1.

<p>Pba de Hipótesis:</p> <p>Ho: Existe linealidad entre las variables Hi: No existe linealidad entre las variables</p> <p>Criterio de aceptación:</p> <p>Si $F_{exp} < F_{tab}$ no se rechaza Ho y existe relación lineal entre las variables</p>
--

Los resultados del análisis de variancia se muestran en las Tablas 15, 16 y 17. En todos los casos se obtuvo que $F_{exp} < F_{tab}$, por lo tanto no se rechaza Ho y se determina finalmente con un 98% de confianza que existe una relación lineal entre las variables de los tres sistemas que se ensayaron.

Fuente de variación	gl	SC	MC	F_{exp}
Desviación de medias debida a la regresión	3	3.193	1.064	5.195
Desviación debida a la media	10	2.048	0.205	
$F_{(0.98, 3, 10)} = 6.55$				

Tabla 15. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del sistema de guaifenesina.

Fuente de variación	gl	SC	MC	F _{exp.}
Desviación de medias debida a la regresión	3	3.460 $\times 10^{-4}$	1.820 $\times 10^{-4}$	2.700
Desviación debida a la media	10	6.730 $\times 10^{-4}$	6.730 $\times 10^{-5}$	
F _{0.99, 3, 10} = 6.55				

Tabla 16. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del sistema del clorhidrato de pseudoefedrina.

Fuente de variación	gl	SC	MC	F _{exp.}
Desviación de medias debida a la regresión	3	1.950 $\times 10^{-4}$	6.500 $\times 10^{-5}$	3.385
Desviación debida a la media	10	6.730 $\times 10^{-4}$	6.730 $\times 10^{-5}$	
F _{0.99, 3, 10} = 6.55				

Tabla 17. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del sistema del bromhidrato de dextrometorfán.

Se determinó si el intercepto era estadísticamente igual a cero. Para ello se realizó el tratamiento estadístico de la prueba del intercepto (Ver Anexo 3) y se propuso una prueba de hipótesis para ser comprobada por medio de t de student (Cuadro 2).

Cuadro 2.

Pba de Hipótesis:

H_0 : b igual a cero

H_1 : b diferente de cero

Criterio de aceptación:

Si $t_{exp} < t_{tab}$ no se rechaza H_0 y el intercepto es estadísticamente igual a cero.

El análisis de resultados del tratamiento estadístico se muestran en la Tabla 18. En todos los casos la t_{exp} fue menor a la t_{tab} , por lo tanto, no se rechaza H_0 y se acepta estadísticamente con un 95% de confianza que los interceptos para cada una de las curvas se pueden considerar como cero.

P. activo	Parámetros			
	b	Sb	t_{exp}	I. C.
Gu	-0.840	8.512	-0.099	-19.226, +17.546
P.HCL	-0.090	0.114	-0.792	- 0.336, + 0.156
D.Br	-0.144	0.073	-1.973	- 0.302, + 0.014
$t_{tab}(0.975, 18) = 2.160$				

Tabla 18. Resultados del tratamiento estadístico para la determinación del intercepto para guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán (b = ordenada al origen, Sb = desviación estándar de la ordenada al origen, I.C. = intervalo de confianza).

En el análisis de resultados para determinar la precisión del sistema se obtuvieron coeficientes de variación de 0.97 %, 0.72 %, y 1.46 % para clorhidrato de pseudoefedrina, bromhidrato de dextrometorfán y guaifenesina, respectivamente con lo cual se demostró que el método era preciso.

-Linealidad del método.

Los resultados obtenidos de la linealidad del método (Tablas 19, 20 y 21) fueron sometidos a un análisis de regresión y correlación. Este análisis indicó que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada para cada uno de los activos (Tabla 22).

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)		
		ensayo 1	ensayo 2	ensayo 3
90	90.04	89.85	90.04	89.80
96	95.60	95.53	95.48	95.70
100	100.97	101.13	101.00	100.90
105	104.00	105.00	105.00	104.76
112	112.70	112.62	112.42	112.37

Tabla 19. Resultados para la determinación de la linealidad del método para guaifenesina.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)		
		ensayo 1	ensayo 2	ensayo 3
90	27.53	27.43	27.47	27.44
96	28.71	28.74	28.69	28.78
100	30.29	30.12	30.23	30.19
105	31.44	31.40	31.45	31.33
112	31.19	33.21	33.12	33.10

Tabla 20. Resultados para la determinación de la linealidad del método para clorhidrato de pseudoefedrina.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)		
		ensayo 1	ensayo 2	ensayo 3
90	13.58	13.57	13.68	13.61
96	14.39	14.50	14.33	14.41
100	15.26	15.11	15.00	14.93
105	15.94	15.70	15.70	15.88
112	16.93	16.75	16.83	16.88

Tabla 21. Resultados para la determinación de la linealidad del método para bromhidrato de dextrometorfán.

P. activo	Parámetros			
	r	r ²	m	b
Gu	0.998	0.997	1.007	-0.568
PHCL	0.999	0.999	0.997	0.027
DBr	0.995	0.990	0.989	0.826

Tabla 22. Parámetros de regresión (r), correlación (r²), pendiente (m) y ordenada al origen (b), para linealidad del método.

Se propuso una prueba de hipótesis (Cuadro 1) para la linealidad del método de cada uno de los principios activos. Para conocer si la hipótesis nula era aceptada o rechazada se realizó un análisis de variancia. Los resultados se muestran en las Tablas 23, 24 y 25.

Fuente de variación	gl	SC	MC	F _{exp.}
Desviación de medias debida a la regresión	3	0.200	0.066	1.300
Desviación debida a la media	10	0.495	0.049	
F _{tab (0.99, 3, 10)} = 6.55				

Tabla 23. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del método para guaifenesina.

Fuente de variación	gl	SC	MC	F _{exp.}
Desviación de medias debida a la regresión	3	0.035	0.012	5.220
Desviación debida a la media	10	0.022	2.295 $\times 10^{-3}$	
F _{tab (0.99, 3, 10)} = 6.55				

Tabla 24. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del método para clorhidrato de pseudoefedrina.

Fuente de variación	gl	SC	MC	$F_{exp.}$
Desviación de medias debida a la regresión	3	0.102	0.034	0.415
Desviación debida a la media	10	0.829	0.082	
$F_{tab}(0.99, 3, 10) = 6.55$				

Tabla 25. Análisis de variancia para la determinación de la linealidad del método para bromhidrato de dextrometorfán.

En todos los casos se obtuvo que $F_{exp} < F_{tab}$, por lo tanto, no se rechaza H_0 y se determina, con un 98 % de confianza, que existe una relación lineal entre las variables estudiadas en la determinación de cada uno de los tres principios activos que se ensayaron.

Se determinó si los interceptos de las rectas obtenidas eran estadísticamente iguales a cero, para lo cual se realizó la prueba del intercepto y se propuso una prueba de hipótesis (Cuadro 2). Los resultados de la prueba del intercepto son mostrados en la Tabla 26.

P. activo	Parámetros			
	b	Sb	t_{exp}	I. C.
Gu	-0.568	5.997	-0.095	-13.521, +12.386
PHCL	0.027	0.975	0.028	- 2.079, + 2.133
DBr	0.826	1.542	0.536	- 2.836, + 0.538
$t_{tab}(0.975, 13) = 2.160$				

Tabla 26. Resultados del tratamiento estadístico para la determinación del intercepto para la guafenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán.

En todos los casos $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$, por lo tanto, no se rechaza H_0 y los interceptos para cada una de las curvas de la linealidad del método son con un 95 % de confianza, estadísticamente iguales a cero. La relación que existe entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada indica tener un comportamiento descrito por la ecuación:

$$y = 1.007x - 0.568 \text{ para guaifenesina.}$$

$$y = 0.997x + 0.027 \text{ para clorhidrato de pseudoefedrina.}$$

$$y = 0.989x + 0.826 \text{ para bromhidrato de dextrometorfán.}$$

- Exactitud y precisión.

La exactitud del método fue evaluada a 3 niveles de concentración. Los datos para la determinación de exactitud se muestran en la Tabla 27. Se evaluó la exactitud del método haciendo uso del tratamiento estadístico de comparación de muestras con un valor estándar. Se propuso una prueba de hipótesis (Cuadro 3) y se determinó el valor de t_{exp} (Tabla 28).

Cuadro 3.

Pba de Hipótesis:

H_0 : El método es exacto.

H_1 : El método no es exacto.

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ se acepta H_0 y entonces el método es exacto.

P. activo	Nivel de concentración (%)		
	90	100	112
Gu	99.37	99.73	100.27
	99.75	99.85	100.02
	99.93	99.00	100.00
	98.76	99.01	99.75
	100.00	100.19	99.21
	100.14	100.32	99.15
PHCL	99.86	100.00	99.97
	99.60	99.90	98.73
	99.64	99.97	99.86
	99.56	100.10	99.88
	100.15	99.73	100.06
	100.00	99.63	99.97
DBr	98.97	100.07	100.42
	98.84	99.74	99.94
	99.85	99.54	98.95
	99.92	99.21	99.53
	99.49	98.64	100.00
	100.00	100.20	99.94

Tabla 27. Porcentajes de recobro para la determinación de la precisión y exactitud del método.

P. activo	Nivel de conc. %	Parámetros			I. C.
		x	S	t _{exp}	
Gu	90	99.66	0.514	1.628	99.119 - 100.198
	100	99.68	0.568	1.366	99.084 - 100.276
	112	99.73	0.460	1.422	99.247 - 100.213
PHCL	90	99.82	0.249	1.789	99.557 - 100.079
	100	99.89	0.177	1.549	99.703 - 100.074
	112	99.75	0.502	1.243	99.212 - 100.272
DBr	90	99.51	0.503	2.378	98.984 - 100.040
	100	99.57	0.578	1.836	98.960 - 100.173
	112	99.80	0.502	0.964	99.270 - 100.323

t_{tab(0.975, 5)} = 2.571

Tabla 28. Datos obtenidos del tratamiento estadístico para la determinación de la exactitud del método (x = promedio, S = desviación estándar, I.C. = intervalo de confianza).

El método resultó ser, con un 95 % de confianza, exacto a los niveles de concentración de 90%, 100% y 112% para cada uno de los principios activos, ya que en todos los casos t_{exp} fue menor que t_{tab} .

La precisión del método se evaluó con los datos obtenidos para la exactitud (Tabla 27). El tratamiento estadístico realizado a estos datos fue la determinación del coeficiente de variación, el cual se determinó para cada uno de los principios activos en cada nivel de concentración. Los resultados se muestran en la Tabla 29.

P. activo	Nivel de conc. %	C.V. (%)
GU	90	0.516
	100	0.570
	112	0.461
PHCL	90	0.249
	100	0.177
	112	0.503
DBr	90	0.505
	100	0.581
	112	0.503

Tabla 29. Resultados para la determinación de la precisión del método (C.V. = coeficiente de variación).

Para determinar que existe precisión en un método cromatográfico, el coeficiente de variación debe ser menor a 1.5 %. En este caso el método optimizado es preciso, ya que todos los valores obtenidos son menores al valor establecido.

- Reproducibilidad entre días.

Los resultados de los análisis efectuados para conocer la precisión entre días se presentan en las Tablas 30, 31 y 32.

Nivel de conc. (%)	Día 1			Día 2		
90	99.37 98.76	99.75 100.00	99.93 100.14	99.95 100.19	99.73 100.00	99.25 —
100	99.73 99.01	99.85 100.19	99.00 100.32	100.34 100.00	99.71 99.46	99.23 —
112	100.27 99.75	100.02 99.21	100.00 99.15	99.94 100.39	98.99 99.37	99.52 —

Tabla 30. Porcentajes de recobro de guaifenesina para dos días diferentes a 3 niveles de concentración.

Nivel de conc. (%)	Día 1			Día 2		
90	99.96 99.56	99.60 100.15	99.64 100.00	99.63 99.70	100.00 101.03	99.75 —
100	100.00 100.10	99.90 99.73	99.97 99.63	99.24 100.00	99.53 99.70	98.71 —
112	99.97 99.88	98.73 100.06	99.86 99.97	99.94 99.00	99.64 99.70	98.68 —

Tabla 31. Porcentajes de recobro del clorhidrato de pseudoefedrina para dos días diferentes a 3 niveles de concentración.

Nivel de conc. (%)	Día 1			Día 2		
	90	98.97 99.92	98.84 99.45	99.85 100.00	100.00 100.00	100.67 99.92
100	100.07 99.21	99.74 98.64	99.54 100.20	101.35 99.41	99.34 98.42	99.53 —
112	100.42 99.53	99.94 100.00	98.95 99.94	99.52 99.00	99.71 99.39	99.94 —

Tabla 32. Porcentajes de recobro del bromhidrato de dextrometorfán para dos días diferentes a 3 niveles de concentración.

El tratamiento estadístico realizó por el método de comparación de dos conjuntos de datos (Ver Anexo 3) y se propuso una prueba de hipótesis (Cuadro 4).

Cuadro 4.

<p>Pba de Hipótesis:</p> <p>Ho: No existe diferencia entre días Hi: Existe diferencia entre días</p> <p>Criterio de aceptación:</p> <p>Si $t_{exp} < t_{tab}$ se acepta Ho y por lo tanto no existe diferencia significativa entre días.</p>
--

Se determinó el promedio aritmético, el coeficiente de variación y la desviación estándar para cada concentración y cada principio activo, para obtener los datos de la Tabla 33, con los cuales se establece, con un 95 % de confianza, que no existe diferencia entre días para ningún principio activo en ninguna de las concentraciones evaluadas, ya que en todos los casos t_{exp} fue mayor a t_{tab} , por lo cual no se rechazó Ho en ningún caso.

P. activo	Nivel de conc. %	Parámetros			t _{exp}
		x	s	C.V.	
Gu	90	99.82	0.360	0.360	-0.542
	100	99.75	0.438	0.439	0.224
	112	99.64	0.539	0.541	0.238
PHCL	90	100.02	0.581	0.580	-0.612
	100	99.44	0.490	0.493	1.679
	112	99.39	0.529	0.532	0.920
DBr	90	99.93	0.577	0.577	-1.027
	100	99.61	1.068	1.072	-0.063
	112	99.51	0.353	0.355	0.662

t_{tab(0.975, 9)} = 2.262.

Tabla 33. Resultados obtenidos del tratamiento estadístico efectuado para conocer la repetibilidad del método (x = promedio, s = desviación estándar, I.C. = intervalo de confianza)

- Reproducibilidad entre analistas.

Para determinar si existía diferencia significativa entre los resultados del método optimizado obtenidos por dos analistas (Tablas 34, 35 y 36), se realizó un análisis de variancia con un diseño desbalanceado planteando una prueba de hipótesis (Cuadro 5).

% Conc.	Dia 1			Dia 2		
	90	100	112	90	100	112
Analista						
1	99.95	100.34	99.94	99.79	100.13	99.93
	99.73	99.71	98.99	100.00	100.00	99.75
	99.25	99.23	99.52	99.73	99.89	99.71
	100.19	100.00	100.39	—	—	—
	100.00	99.46	99.37	—	—	—
2	100.64	100.21	100.00	99.75	101.31	99.70
	98.99	99.97	99.97	—	—	—

Tabla 34. Porcentajes de recobro de guaifenesina de los dos analistas, en dos días diferentes a 3 niveles de concentración.

% Conc.	Dia 1			Dia 2		
	90	100	112	90	100	112
Analista						
1	99.63	99.24	99.94	99.64	99.44	100.06
	100.00	99.53	99.64	99.78	99.80	99.79
	99.75	98.71	98.68	99.66	99.67	99.73
	99.70	100.00	99.00	—	—	—
	101.03	99.70	99.70	—	—	—
2	100.00	100.30	98.90	99.37	99.52	99.64
	99.23	99.68	98.18	—	—	—

Tabla 35. Porcentajes de recobro del clorhidrato de pseudoefedrina de los dos analistas, en dos días diferentes a 3 niveles de concentración.

% Conc.	Dia 1			Dia 2		
	90	100	112	90	100	112
Analista						
1	100.00	101.35	99.52	99.93	99.02	98.94
	100.67	99.34	99.71	100.74	98.30	99.41
	99.05	99.53	99.94	100.22	97.84	99.70
	100.00	99.41	99.00	—	—	—
	99.92	98.42	99.39	—	—	—
2	99.32	99.93	99.46	100.15	100.27	99.46
	99.93	100.49	99.58	—	—	—

Tabla 36. Porcentajes de recobro del bromhidrato de dextrometorfán de los dos analistas, en dos días diferentes, a 3 niveles de concentración.

Cuadro 5.

<p>Pba de Hipotesis:</p> <p>Ho: No existe diferencia entre analistas Hi: Existe diferencia entre analistas</p> <p>Criterio de aceptación:</p> <p>Si $F_{exp} < F_{tab}$ se acepta Ho y entonces no existe diferencia entre analistas.</p>
--

Los resultados obtenidos de los análisis de variancia se muestran en las Tablas 37, 38 y 39.

Fuente de variación	gl	Nivel de conc. %	SC	MC.
Desviación entre analistas	1	90	2.6×10^{-2}	2.6×10^{-2}
		100	0.926	0.926
		112	0.079	0.079
Desviación de días dentro de analistas	7	90	4.0×10^{-3}	5.714×10^{-4}
		100	0.824	0.118
		112	0.101	0.014
Desviación de replicaciones dentro de días	2	90	1.920	0.960
		100	1.118	0.559
		112	1.188	0.594
(90%) $F_{exp}(1,7) = 4.55$		$F_{exp}(7,2) = 5.95 \times 10^{-2}$		
(100%) $F_{exp}(1,7) = 7.84$		$F_{exp}(7,2) = 0.211$		
(112%) $F_{exp}(1,7) = 5.49$		$F_{exp}(7,2) = 0.024$		
$F_{tab}(0.975,1,7) = 8.07$		$F_{tab}(0.975,7,2) = 39.36$		

Tabla 37. Análisis de variancia para la determinación de reproducibilidad entre analistas en el ensayo de guaifenesina, a tres niveles de concentración.

Fuente de variación	gl	nivel de conc. %	SC	MC.
Desviación entre analistas	1	90	0.281	0.281
		100	0.214	0.214
		112	0.943	0.943
Desviación de días dentro de analistas	7	90	0.256	0.037
		100	0.223	0.032
		112	1.233	0.176
Desviación de replicaciones dentro de días	2	90	1.632	0.816
		100	1.246	0.623
		112	1.402	0.701
(90%) $F_{exp}(1,7) = 7.60$		$F_{exp}(7,2) = 0.045$		
(100%) $F_{exp}(1,7) = 6.72$		$F_{exp}(7,2) = 0.051$		
(112%) $F_{exp}(1,7) = 5.36$		$F_{exp}(7,2) = 0.251$		
$F_{tab}(0.975,1,7) = 8.07$		$F_{tab}(0.975,7,2) = 39.36$		

Tabla 38. Análisis de variancia para la determinación de reproducibilidad entre analistas en el ensayo de clorhidrato de pseudoefedrina, a tres niveles de concentración.

Fuente de variación	gl	nivel de conc. %	SC	MC.
Desviación entre analistas	1	90	0.167	0.167
		100	2.572	2.572
		112	3×10^{-3}	3×10^{-3}
Desviación de días dentro de analistas	7	90	0.460	0.066
		100	2.781	0.397
		112	0.051	7.286×10^{-3}
Desviación de replicaciones dentro de días	2	90	2.060	1.030
		100	5.263	2.632
		112	0.799	0.400

(90%) $F_{\text{MD}}(1,7) = 2.53$	$F_{\text{MD}}(7,2) = 0.064$
(100%) $F_{\text{MD}}(1,7) = 6.48$	$F_{\text{MD}}(7,2) = 0.151$
(112%) $F_{\text{MD}}(1,7) = 0.412$	$F_{\text{MD}}(7,2) = 0.018$
$F_{\text{tab}}(0.975,1,7) = 0.07$	$F_{\text{tab}}(0.975,7,2) = 39.36$

Tabla 39. Análisis de variancia para la determinación de reproducibilidad entre analistas en el ensayo de bromhidrato de dextrometorfán, a tres niveles de concentración.

En todos los casos F_{MD} es menor que F_{tab} , por lo tanto, se rechaza H_0 lo que indica, con un 95% de confianza, que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 para ninguno de los principios activos en los tres niveles de concentración que se estudiaron.

CONCLUSIONES .

1. Mediante la modificación de los valores de las variables que afectan significativamente al método primario, se obtuvo un método notoriamente más adecuado, el cual cuenta con mejor resolución, mayor coeficiente de separación y menor asimetría en los picos cromatográficos; cumpliéndose así el objetivo de optimización.

2. El método optimizado es, de acuerdo con el estudio de validación realizado, lineal, preciso, exacto, repetible y reproducible, en un intervalo de concentración de 90 % a 112 %.

3. Las ventajas del método optimizado con respecto al método primario son:

- a) Mayor confiabilidad.
- b) Minimización de errores aleatorios por el uso de estándar interno.
- c) Rapidez en la obtención de resultados gracias al aumento de la precisión.
- d) Disminución del ruido y la deriva en la línea base de los cromatogramas debido a la modificación de la proporción de agua en la fase móvil.

A N E X O S .

A N E X O 1.

Determinación simultánea de guaifenesina, clorhidrato de pseudoefedrina y bromhidrato de dextrometorfán. Método del laboratorio de control de calidad (método primario).

2. Descripción del método primario.

-Preparación de la muestra.

- a. Mezclar el contenido de 20 cápsulas.
- b. Pesar 3g del mezclado anterior y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml.
- c. Adicionar 30 ml de agua destilada.
- d. Calentar en baño de agua por 10 minutos.
- e. Llevar a volumen con agua destilada.
- f. Filtrar la solución a través de un filtro millipore.
- g. Tomar una alícuota de 10 ml del filtrado y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml.
- h. Llevar a volumen con metanol grado reactivo.
- i. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 um y transferir la solución filtrada a un bial.
- j. Someter la muestra a la separación cromatográfica con las siguientes condiciones:

fase móvil:	Metanol: agua: Dietilamina pH=2.5 (179 : 20 : 1).
velocidad de flujo:	1.0 ml/min.
detección U.V.:	254 nm.
volumen de inyección:	10 µl.
atenuación:	2.

- Preparación del estándar.

- a. Pesar 240 mg de clorhidrato de pseudoefedrina y 120 mg de bromhidrato de dextrometorfán y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml.
- b. Adicionar 50 ml de agua y agitar hasta completa disolución.

- c. Llevar a volumen con agua (solución A).
- d. Pesar 80 mg de guaifenesina.
- e. Transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml.
- f. Adicionar 50 ml de metanol grado reactivo.
- g. Agitar hasta disolución.
- h. Adicionar 10 ml de la solución A.
- i. Llevar a volumen con metanol grado reactivo.
- j. Filtrar y transferir la solución a un bial.
- k. Someter la muestra a la separación cromatográfica con las siguientes condiciones:

fase móvil:	Metanol: agua: Dietilamina pH=2.5 (179 : 20 : 1).
velocidad de flujo:	1.0 ml/min.
detección U.V.:	254 nm.
volumen de inyección:	10 µl.
atenuación:	2.

La cuantificación cromatográfica se efectuó por el método de estándar externo, utilizando como repuesta analítica el área de los picos.

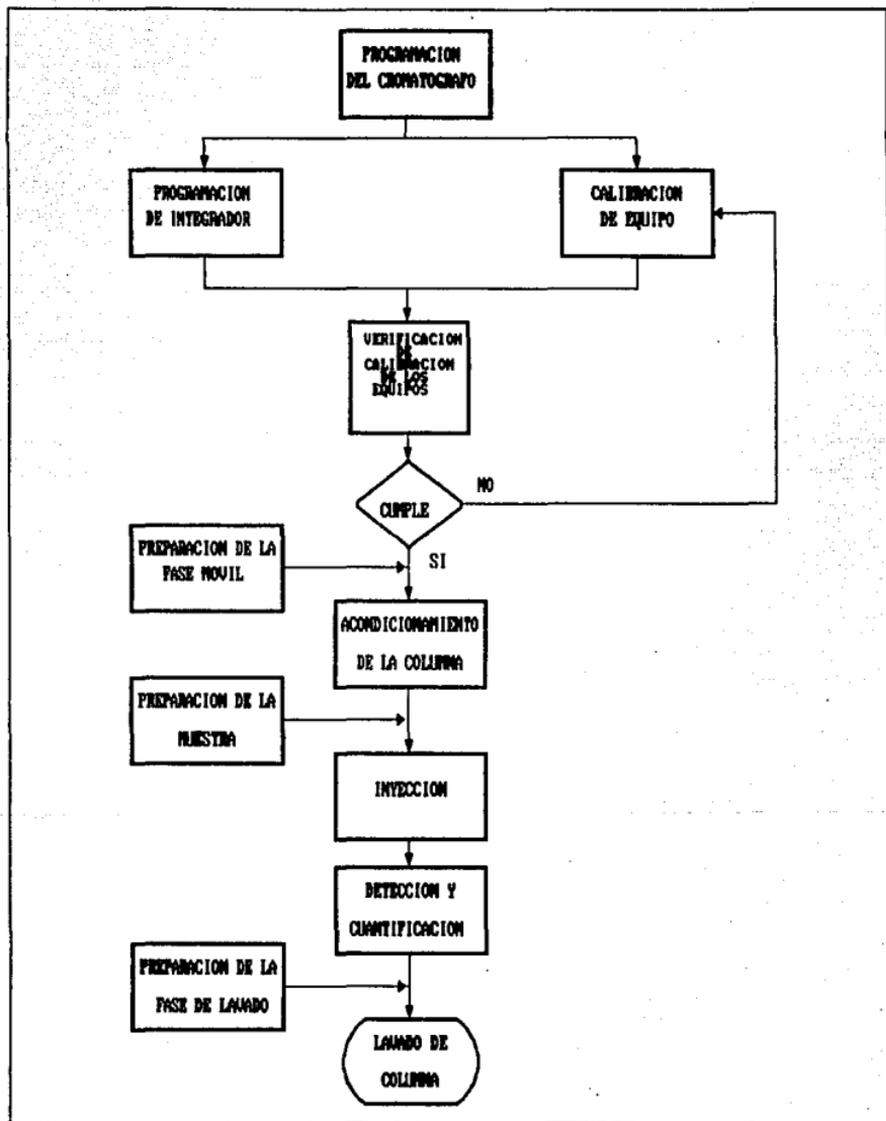


Fig. 20. Diagrama de flujo en donde se muestran las condiciones normales de operación.

A N E X O 2.

Descripción del método optimizado.

-Preparación de la muestra.

- a. Mezclar el contenido de 20 cápsulas.
- b. Transferir 3g del mezclado anterior a un matraz volumétrico de 100 ml.
- c. Adicionar 30 ml de agua destilada.
- d. Calentar en baño de agua durante 10 minutos.
- e. Llevar a volumen con agua destilada.
- f. Filtrar la solución a través de un filtro millipore (solución A).
- g. Pesar 50 mg de isotipendilo y transferirlo a un matraz volumétrico de 50 ml.
- h. Adicionar 25 ml de agua y agitar hasta completa disolución; llevar a volumen con agua.
- i. Tomar una alícuota de 5 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml; llevar a volumen con agua destilada (solución B).
- j. Tomar una alícuota de 5 ml de la solución A y una alícuota de 4 ml de la solución B; transferirlas a un matraz volumétrico de 100 ml.
- k. Llevar a volumen con metanol grado reactivo.
- l. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 μ m y transferirla a un bial.
- m. Someter la muestra a la separación cromatográfica con las siguientes condiciones:

fase móvil:	Metanol: agua: Dietilamina pH=2.5 (474 : 25 : 1).
velocidad de flujo:	1.0 ml/min.
detección U.V.:	263 nm.
volumen de inyección:	5 μ l.
atenuación:	1.

- Preparación del estándar.

- a. Pesar 120 mg de clorhidrato de pseudoefedrina y 60 mg de bromhidrato de dextrometorfán y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml.

- b. Adicionar 50 ml de agua y agitar hasta completa disolución.
- c. Llevar a volumen con agua (solución A).
- d. Pesar 50 mg de isotipendilo y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml.
- e. Adicionar 25 ml de agua y agitar hasta completa disolución; Llevar a volumen con agua.
- f. Tomar una alícuota de 5 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml; Llevar a volumen con agua destilada (solución B).
- g. Pesar 40 mg de guaifenesina.
- h. Transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml.
- i. Adicionar 50 ml de metanol grado reactivo.
- j. Agitar hasta disolución.
- k. Adicionar 10 ml de la solución A y 4 ml de la solución B.
- l. Llevar a volumen con metanol grado reactivo.
- m. Filtrar y transferir la solución a un bial.
- n. Someter la muestra a la separación cromatográfica con las siguientes condiciones:

fase móvil:	Metanol: agua: Dietilamina pH=2.5 (474 : 25 : 1).
velocidad de flujo:	1.0 ml/min.
detección U.V.:	263 nm.
volumen de inyección:	5 µl.
atenuación:	1.

La cuantificación cromatográfica se efectuó por el método de estándar interno, utilizando como respuesta analítica la altura de los picos.

ANEXO 3.

Utilización de métodos estadísticos para conocer la confiabilidad de los resultados obtenidos (44.45.46.47).

1. . Regresión Lineal.

Las técnicas estadísticas usadas para estudiar las relaciones entre las variables se clasifican como técnicas de regresión y correlación.

La regresión se usa para determinar la "mejor" relación funcional entre las variables, mientras que la correlación se utiliza para medir el grado de asociación de las distintas variables. Si las variables X y Y están relacionadas de tal manera que una de ellas puede predecirse mejor si se conoce la otra, se dice que están correlacionadas, si no lo están, decimos que son funcionalmente independientes.

La ecuación con la que se describe el coeficiente de regresión es:

$$r = \frac{n \Sigma (xy) - \Sigma (x)(y)}{[\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2] [\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2]}$$

donde:

- r = coeficiente de regresión.
- n = número de parejas ordenadas.
- Σ = sumatoria
- x = variable independiente.
- y = variable dependiente.

Y el coeficiente de correlación es el cuadrado del coeficiente de regresión.

r^2 = coeficiente de correlación.

La determinación de los parámetros de la recta (pendiente y ordenada al origen, se realiza mediante el método estadístico llamado mínimos cuadrados. Este método establece un criterio estandarizado para definir la ecuación de la recta, y se basa en suponer que la mejor recta de regresión es mínima, lo cual queda establecido por las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{n \Sigma (xy) - \Sigma (x) \Sigma (y)}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma y - m \Sigma x}{n}$$

donde:

m = pendiente de la recta.

b = ordenada al origen.

Σ = sumatoria

x = variable independiente.

y = variable dependiente.

El estudio de las variaciones en la recta se realiza mediante un análisis de variancia. El análisis de variancia divide la variación total de los resultados de acuerdo a las diferentes fuentes de variación, presentandose de la siguiente manera:

$$\begin{array}{ccc} \text{variación} & \text{variación} & \text{variación} \\ \text{total} & \text{no explicada} & \text{explicada} \\ \\ \Sigma (Y_i - \bar{Y})^2 = & \Sigma (Y_i - Y^*_i)^2 & + \quad \Sigma n_i (Y^*_i - \bar{Y})^2 \end{array}$$

donde:

\bar{Y}_i = Respuesta promedio.

Y^*_i = Respuesta estimada.

Y_i = Respuesta individual.

n = Número de parejas ordenadas.

Se construye una Tabla de análisis de variancia.

Fuente de variación	gl	SC	MC	$F_{exp.}$
Desviación de medias debida a la regresión	$r - 2$	q_1	$q_1/r-2$	$q_1/r-2$
Desviación debida a la media	$n - r$	q_2	$q_2/n-r$	$q_2/n-r$
Desviación total	$n - 2$	q		

donde:

gl = grados de libertad.

SC = Suma de cuadrados.

- MC = Media de cuadrados.
 F_{exp} = F experimental.
 n = Número total de parejas de datos.
 r = Número de concentraciones.
 i = Concentración.
 j = Replicación.
 q_1 = Desviaciones de Los puntos con respecto a la recta.

$$q_1 = \sum \eta_i (\bar{Y}_i - Y^*_i)^2$$
 q_2 = Desviaciones de cada punto con respecto a su propia media.

$$q_2 = \sum \sum (Y_{i,j} - \bar{Y}_i)^2$$
 q = Desviaciones totales al cuadrado.

$$q = \sum \sum (Y_{i,j} - Y^*)^2$$
 Y = Respuesta
 \bar{Y} = Respuesta promedio.
 Y^* = Respuesta estimada.
 η = Valor estimado de la línea de regresión.

Para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse al error aleatorio se realiza una prueba de hipótesis para el intercepto con las siguientes ecuaciones:

$$q = (S^2y - m^2S^2x)(n - 1)$$

$$S_{y/x} = (q/n-2)^{-1/2}$$

$$S_b = S_{y/x} \left[\sum x^2 / (n-1)S^2x \right]^{-1/2}$$

$$t_{exp} = \frac{b}{S_b}$$

$$I.C. = b \pm t_{tab} (S_b)$$

donde:

S_x = desviación estándar de x .

S_y = desviación estándar de y .

IC = Intervalo de confianza.

t_{exp} = t experimental.

t_{tab} = t tablas

m = pendiente.

x = variable independiente.

y = variable dependiente.

b = ordenada al origen.

2. Exactitud y precisión de un método analítico.

El análisis que se realiza para conocer la exactitud de un método es el tratamiento de comparación de datos con un valor estándar y se realiza calculando el promedio aritmético y la desviación estándar, para obtener:

$$t_{exp} = \frac{x^* - \bar{x}}{S/\sqrt{n-1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n - 1}}$$

$$I.C. = \frac{s}{\bar{x}} \cdot t_{\alpha/2, n-1}$$

donde:

x^* = Valor de x estándar.

x = Variable independiente.

\bar{x} = Valor promedio.

S = Desviación estándar.

n = Número total de datos.

Para evaluar la precisión se determina el coeficiente de variación, el cual permite comparar diversas muestras entre sí, a pesar de tener diferentes valores de media aritmética. La fórmula es la siguiente:

$$C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

3. Reproducibilidad entre días.

Este estudio se determinó mediante el tratamiento estadístico de comparación de dos conjuntos de datos, para conocer si existe diferencia entre los resultados obtenidos cada día, mediante el uso de las siguientes ecuaciones:

$$S_c = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_c \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

donde:

n = Número de datos.

\bar{x} = Valor promedio.

S = Desviación estándar.

4. Reproducibilidad entre analistas^(***).

El estudio se realizó mediante un análisis de variancia para diseños desbalanceados de 3 componentes.

Generalmente se espera realizar todas las pruebas de un diseño experimental correctamente y sin que ocurran accidentes, para obtener una colección balanceada de resultados. En la práctica ocurren accidentes y el desbalance de los resultados es trivial. La eliminación de los datos no concordantes es la mejor manera de tratar estos datos. A veces, sin embargo, el desbalance está tan difundido y la pérdida potencial de información es tan grande, que

debemos tratar la totalidad de los datos desbalanceados de la mejor manera posible.

La Tabla de análisis de variancia se constituye de la siguiente manera:

Fuente de variación	gl	SC	MC	Fexp
Desviación entre analistas	$p - 1$	A	D	$\frac{D}{F}$
Desviación de días dentro de analistas	$R - p$	B	E	$\frac{E}{F}$
Desviación de replicaciones dentro de días	$N - R$	C	F	

donde:

x = Respuesta.

N = Número total de datos.

R = Número de días entre analistas.

p = Número de analistas.

n_c = Número de datos por analista.

n_j = Número de datos por día.

L = Analista.

j = Día.

$D = A / (p - 1)$

$E = B / (R - p)$

$F = C / (N - R)$

$$R = N - p$$

R = Suma de cuadrados por analista.

$$R = \sum \frac{T_L^2}{n_L} - \frac{(\sum T_L)^2}{N}$$

B = Suma de cuadrados por día entre analistas.

$$B = \sum \frac{\sum T_j^2}{n_j} - \sum \frac{T_L^2}{n_L}$$

C = Suma de cuadrados por repeticiones.

$$C = \sum (\sum x_{ij}^2) - (\sum T_j^2 / n_j)$$

$$T_j = \sum x_{ij} / n_i$$

$$T_L = \sum x_{Lj}$$

$$T_i = \sum x_{ij}$$

Ejemplo:

calculos para guaifenesina para el 100 %.

Analista	Dia 1			Dia 2		
			% Recobro			
1	100.34	99.71	99.23	100.13	100.00	99.89
	100.00	99.46				
2	100.21	99.97	—	101.31	—	—

Tratamiento de Los datos

	ΣX_j^2	T_{1j}	n_{1j}	T_{2j}	n_{2j}	$\Sigma T_{1j}^2/n_{1j}$	T_L
	79753.113	498.74	5	300.02	3	79752.318	798.76
	30299.761	200.18	2	101.31	1	30299.732	301.49
Σ	110052.874	698.92	7	401.33	4	110052.050	1100.25

	n_L	T_L^2/n_L
	8	79752.192
	3	30298.740
Σ	11	110050.932

$$B = 110052.050 - 110050.932 = 1.118$$

$$R = 110050.932 - 110050.006 = 0.926$$

$$C = 110052.874 - 110052.050 = 0.824$$

Análisis de variancia.

Fuente de variación	gl	SC	MC	Fexp
Desviación entre analistas	1	0.926	0.926	7.84
Desviación de días dentro de analistas	7	0.824	0.118	0.211
Desviación de repeticiones dentro de días	2	1.118	0.559	—
$F_{exp}(0.975, 1, 7) = 8.07$		$F_{exp}(0.975, 7, 7) = 39.36$		

A N E X O 4

CARACTERIZACION DE LAS TAREAS ANALITICAS MAS IMPORTANTES EN ANALISIS FARMACEUTICO.

Tarea Analítica	Símbolo	Características				
		Resolución recomendada			pico	objetivo de análisis
		Rsb	Rsa	Rsm		
Análisis de materias primas: Extractos de plantas.	A					
Extractos de órganos animales.	A-1	1.5	1.8	1.0	L	T
Mezcla de fermentación.	A-2	1.5	1.8	1.0	L	T
	A-3	1.2	1.5	1.0	L	T
Análisis de intermediarios y productos crudos:	B					
Intermediarios y productos crudos.	B-1	1.3	1.5	0.8	E	T
Mezcla de reacción.	B-2	1.2	1.5	0.8	E	A
Aguas madres y productos secundarios.	B-3	1.3	1.8	0.8	L	T
Análisis de principios activos:	C					
Prueba de pureza.	C-1	1.8	2.0	1.2	E	T
Ensayo.	C-2	1.2	1.2	0.7	L	A
Separación de compuestos relacionados.	C-3	1.5	1.8	1.0	E	T
Prueba de estabilidad.	C-4	2.0	2.5	1.2	E	A+T
Análisis de productos formulados:	D					
Ensayo.	D-1	1.2	1.2	0.8	L	A
Pureza.	D-2	1.7	2.0	1.0	E	T
Uniformidad de contenido.	D-3	1.2	1.2	1.0	L	A
Disolución.	D-4	1.2	1.2	1.0	L	A
Estabilidad.	D-5	2.5	3.0	1.2	E	A+T
Estudios de farmacocinética y metabolismo.	E	1.5	1.8	1.0	L	T

Rsb = resolución recomendada para el pico anterior del componente principal. Rsa = resolución recomendada para el pico posterior del componente principal. Rsm = resolución mínima. L = número limitado de picos de interés. E = importancia equivalente de picos. T = análisis de trazas. A = ensayo.

Parámetros analíticos	Categoría I			Categoría II	Categoría III
	LN		EN		
	a	b			
Exactitud	++	+	+	+++	++
Precisión	+	++	+	+++	++
Linealidad	+	+	+	++	++
Rango	+	+	+	+	++
Cantidad mínima detectable (LQD)	+++	++	++	(+)	+++
Recobro	+++	(+)	(+)	(+)	(+)
Robustez	++	++	++	++	++
Rsm	+++	++	++	-	+++
Rsb	-	-	++	-	+++
Rsa	-	-	++	-	+++
SR	-	-	++	-	+++
SS	-	-	++	-	+++

Categoría I = análisis de trazas: LN, número limitado de picos de interés; a, en presencia de materiales desconocidos (A-1, A-2, A-3, E); b, número conocido de componentes conocidos (B-3, D-2); EN, todos los picos son de igual importancia (B-1, B-2, C-1). Categoría II = métodos de ensayo (B-2, C-2, D-1, D-3, D-4). Categoría III = separación de compuestos relacionados (C-3, C-4, D-5). Símbolos: +, recomendado (La importancia es expresada por el número de signos +); (+), dependiendo de la tarea analítica; -, la determinación no es necesaria.

CRITERIOS PARA METODOS HPLC.

símbolo	SR	SS ^a	Preparación de la muestra	R.S.D. ^b (%)	Número deseado de picos	Recobro (%)	LDQ ^a
A-1	2.0	nd	Problemática	(5	2-3	Mín. 95	1-5 ng
A-2	2.0	nd	Problemática	(5	2-3	Mín. 95	1-5 ng
A-3	2.0	ni	Problemática	(5	2-3	Mín. 95	1-5 ng
B-1	1.8	+	Fácil	(5	2-5	100	0.1 %
B-2	1.8	ni	Fácil	(2	2-3	100	ni
B-3	1.8	+	Fácil	(5	2-5	100	0.1 %
C-1	2.2	+	Fácil	(2	2-10	100	0.01%
C-2	1.7	ni	Fácil	(1.5	2-3	100	nd
C-3	2.0	+	Fácil	(2	2-5	100	0.01%
C-4	2.2	+	Fácil	(2	2-10	100	0.01%
D-1	1.8	ni	Puede ser problemática	(2	1-2	Mín. 99	nd
D-2	2.0	+	No problemática	(5	2-5	Mín. 98	0.01%
D-3	1.8	ni	Problemática	(2	2-3	Mín. 98	nd
D-4	1.8	ni	nd	(5	2-3	nd	1-5 ng
D-5	2.2	+	No problemática	(2	5-15	Mín. 99	0.1 %
E	2.0	nd	Problemática	(5	2-10	Mín. 90	100 pg

and, no definido; ni, no importante; +, el orden de elución es importante.

b desviación estándar relativa.

A N E X O 5.

Colección de datos obtenidos para la validación del método.

- Linealidad del método.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	90.04	89.85	99.79
		90.04	100.00
		89.80	99.73
96	95.60	95.53	99.93
		95.48	99.87
		95.70	100.10
100	100.97	101.13	100.13
		101.00	100.00
		100.90	99.89
105	104.00	105.00	100.96
		105.00	100.96
		104.76	100.73
112	112.70	112.62	99.93
		112.42	99.75
		112.37	99.71

Tabla. 40 Datos de Guaifenesina

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	27.53	27.43	99.64
		27.47	99.78
		27.44	99.66
96	28.71	28.74	100.15
		28.69	99.93
		28.78	100.24
100	30.29	30.12	99.44
		30.23	99.80
		30.19	99.67
105	31.44	31.40	99.87
		31.35	99.71
		31.33	99.65
112	33.19	33.21	100.06
		33.12	99.79
		33.10	99.73

Tabla. 41. Datos de clorhidrato de pseudoefedrina.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	13.58	13.57	99.93
		13.68	100.74
		13.61	100.22
96	14.39	14.50	100.76
		14.33	99.58
		14.41	100.14
100	15.26	15.11	99.02
		15.00	98.30
		14.93	97.84
105	15.94	15.70	98.49
		15.70	98.49
		15.88	99.62
112	16.93	16.75	98.94
		16.83	99.41
		16.88	99.70

Tabla. 42. Datos de bromhidrato de dextrometorfán.

- Precisión y exactitud.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	91.45	90.87	99.37
	91.61	91.38	99.75
	91.54	90.56	98.93
	91.37	90.24	98.76
	90.54	90.54	100.00
	90.35	90.48	100.14
100	100.31	100.04	99.73
	100.39	100.23	99.85
	101.45	100.44	99.00
	100.10	100.29	100.19
	99.87	100.19	100.32
112	112.19	112.49	100.27
	112.50	112.52	100.02
	112.03	112.03	100.00
	111.53	111.25	99.75
	112.11	111.22	99.21
	113.12	112.16	99.15

Tabla. 44 Datos de guaifenesina.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	26.99	26.98	99.96
	27.23	27.12	99.60
	27.85	27.75	99.64
	27.18	27.06	99.56
	27.39	27.43	100.15
	27.47	27.47	100.00
100	30.21	30.21	100.00
	30.22	30.19	99.90
	30.42	30.41	99.97
	30.12	30.15	100.10
	30.15	30.07	99.73
	30.00	29.89	99.63
112	33.62	33.61	99.97
	33.78	33.35	98.73
	34.96	34.91	99.86
	33.82	33.78	99.88
	33.71	33.73	100.06
	33.84	33.83	99.97

Tabla 45. Datos de clorhidrato de pseudoefedrina.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	13.65	13.51	98.97
	13.80	13.64	98.84
	13.53	13.51	99.85
	13.59	13.58	99.92
	13.60	13.52	99.49
	13.54	13.54	100.00
100	15.04	15.05	100.07
	15.10	15.06	99.74
	15.27	15.20	99.54
	15.31	15.19	99.21
	15.42	15.21	98.64
	14.95	14.98	100.20
112	16.74	16.81	100.42
	16.80	16.79	99.94
	17.21	17.03	98.95
	16.95	16.87	99.53
	16.75	16.75	100.00
	16.44	16.43	99.94

Tabla 46. Datos de bromhidrato de dextrometorfán.

- Repetibilidad

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	90.37	90.33	99.95
	90.27	90.03	99.73
	90.83	90.15	99.25
	89.83	90.00	100.19
	89.99	89.99	100.00
100	99.66	100.00	100.34
	100.26	99.97	99.71
	100.76	99.98	99.23
	100.24	100.24	100.00
	100.27	99.73	99.46
112	112.18	112.11	99.94
	113.35	112.21	98.99
	112.63	112.09	99.52
	111.45	111.89	100.39
	112.66	111.95	99.37

Tabla 47. Datos de guaifenesina .

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	27.08	26.98	99.63
	26.90	26.90	100.00
	27.49	27.42	99.75
	26.99	26.91	99.70
	26.43	26.70	101.03
100	30.23	30.00	99.24
	30.09	29.95	99.53
	30.23	29.84	98.71
	30.15	30.15	100.00
	30.31	30.22	99.70
112	33.62	33.60	99.94
	33.63	33.51	99.64
	34.13	33.68	98.68
	33.84	33.50	99.00
	33.75	33.65	99.70

Tabla 48. Datos del clorhidrato de pseudoefedrina.

Nivel de conc. (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	13.50	13.50	100.00
	13.42	13.51	100.67
	13.64	13.51	99.05
	13.48	13.48	100.00
	13.60	13.60	99.92
100	14.84	15.04	101.35
	15.09	14.99	99.34
	14.80	14.73	99.53
	15.30	15.21	99.41
	15.19	14.95	98.42
112	16.98	16.81	99.00
	16.50	16.42	99.52
	16.96	16.91	99.71
	16.81	16.80	99.94
	16.41	16.31	99.39

Tabla 49. Datos del bromhidrato de dextrometorfán.

- Reproducibilidad entre analistas

Analista 2

Nivel de conc. (%)	Día	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	1	90.33	90.91	100.64
		90.85	89.93	98.99
96	1	96.41	96.34	99.93
		96.45	96.21	99.75
100	2	96.41	96.39	99.98
		99.98	100.19	100.21
105	1	100.24	100.21	99.97
		100.01	101.32	101.31
112	1	106.21	104.69	98.57
		105.01	104.79	99.79
112	2	105.31	104.92	99.63
		112.63	112.63	100.00
112	1	112.13	112.10	99.97
		112.13	111.79	99.70

Tabla 50. Datos de guaifenesina.

Nivel de conc. (%)	Día	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	1	26.79	26.79	100.00
		27.22	27.01	99.24
96	2	27.15	26.98	99.37
		29.00	29.04	100.14
96	1	29.00	28.88	99.59
		28.94	28.91	99.89
100	2	30.20	30.29	100.30
		31.23	31.13	99.68
105	1	30.97	30.82	99.52
		31.50	31.46	99.87
105	2	31.69	31.67	99.94
		31.50	31.55	100.16
112	1	34.50	34.12	98.70
		32.41	31.82	98.18
112	2	33.27	33.15	99.64

Tabla 51. Datos para clorhidrato de pseudoefedrina.

Nivel de conc. (%)	día	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad determinada (mg)	Recobro (%)
90	1	13.22 13.40	13.13 13.39	99.32 99.93
	2	13.34	13.36	100.15
96	1	14.32 14.28	14.33 14.27	100.07 99.93
	2	14.29	14.28	99.93
100	1	14.93 14.98	14.92 15.00	99.93 100.49
	2	14.95	14.99	100.27
105	1	15.63 15.88	15.58 15.90	99.68 100.13
	2	15.79	15.77	99.87
112	1	16.76 16.85	16.67 16.78	99.46 99.58
	2	16.80	16.71	99.46

Tabla 52. Datos del bromhidrato de dextrometorfán.

REFERENCIAS .

1. J. HELMAN. Farmacotécnica. Teoría y práctica, Tomo I. Ed. Cecca, México, D.F., (1989), 1-10.
2. F. ERNI. Use of high-performance liquid chromatography in the pharmaceutical industry. J. Chromatogr., vol. 507 (1990) 141-149.
3. J. R. GANT, M. W. DONG. Practical Benefits of High-Speed Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis. Pharm. Technol., October (1987) 44-58.
4. W. L. PAUL. USP Perspectives on Analytical Methods Validation. Pharm. Technol., March (1991) 130-131.
5. A. ALCANTARA. Validación de métodos analíticos. Pharma News., vol. 1, no. 4 (1990) 19-20.
6. A. C. MEHTA. The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. J. Clin. Pharm. Therap., vol. 14 (1989) 465-473.
7. CLARKE'S. Isolation and Identification of Drugs. 5a. edición. Ed. Staff, Gran Bretaña (1986) 520, 521, 645, 944, 945.
8. A. GOODMAN, L. GILMAN. Bases farmacológicas de la terapéutica. 7a. edición, Ed. Interamericana, México, D.F., (1978), 153-155, 173, 506.
9. K. A. FLOREY. Analytical profiles of drug substances. vol. 8. Ed. Academic Press Inc., USA, (1979) 489-507.
10. MERCK & Co., In. The Merck Index. 10a edición. USA, (1983) 565, 566, 716, 717, 1289.
11. C. DOLLERY. Therapeutics Drugs. Vol I y II. Ed. Churchill Livingstone, USA, (1991) D63-D66, P297-P299.

12. T. KIYOSHI. GLC and HPLC determination of therapeutic agents, Part I y II. Ed. Marcel Dekker Inc., USA, (1979) 417-430, 692-734, 1211-1233.
13. M. K. CHAO, I. J. HOLCOMB, S. A. FUSARI. Ion-Pair Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography of Cough-Cold Syrups I: Pseudoephedrine Hydrochloride, Brompheniramine Maleate, and Dextromethorphan Hydrobromide. *J. Pharm. Sci.*, vol. 68, no. 11 (1979) 1463-1464.
14. L. CARNEVALE. Simultaneous Determination of Acetaminophen, Guaifenesin, Pseudoephedrine, Pholcodine, and Paraben Preservatives in Cough Mixture by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.*, vol. 72, no. 2 (1983) 196-198.
15. E. JACQZ. Dextromethorphan phenotypes determined by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 495 (1989) 361-363.
16. T. M. CHEN, J. R. PACIFICO, R. E. DALY. High-Pressure Liquid Chromatographic Assay of Dextromethorphan Hydrobromide, Guaifenesin, and Sodium Benzoate in an Expectoant Syrup. *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 26, December (1988) 636-639.
17. V. GIBBS, Z. ZAIDI. Evaluation of High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography for Quantitation of Dextromethorphan Hydrobromide in Cough Cold Syrup Preparations. *J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no. 9 (1984) 1248-1251.
18. V. D. GUPTA, A. R. HEBLE. Quantitation of Acetaminophen, Chlorpheniramine Maleate, Dextromethorphan Hydrobromide, and Phenylpropanolamine Hydrochloride in Combination Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no. 11 (1984) 1553-1556.
19. C. CLARK. *Farmacología clínica*. 12a edición. Ed. Panamericana México, D.F., (1990) 405-413.
20. H. C. J. KETCLAARS, J. G. P. PETERS. Determination of guaifenesin and its metabolite, B-(2-methoxyphenoxy) lactic acid, in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 224 (1981) 144-148.
21. S. LOEBL. *Manual de farmacología*. Ed. Limusa. México, D.F., (1986) 315-323.

22. L. SNYDER. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2a. edición. Ed. John Wiley Sons, Inc. USA., (1979) 110-112, 215-233.
23. F. WALTON. Modern chemical analysis and instrumentation. Ed. Marcel Dekker Inc. USA, (1973) 53-59, 68-73, 115-121.
24. USP XXII. Ed. USPC Inc., USA, (1990) 1558-1563, 1710-1712.
25. A. QUATTROCCHI. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro S.A., Argentina, (1992) 407 p.p.
26. M. VALCARCEL. Técnicas analíticas de separación. Ed. Reverté, España, (1988) 778 p.p.
27. M. GARCIA. Cromatografía Líquida de alta resolución. Ed. Limusa. México, D.F., (1988) 252 p.p.
28. W. YOST. Introducción a la cromatografía líquida práctica. Ed. Perkin-Elmer. USA, (1980) 263 p.p.
29. D. SKOOG. Análisis instrumental. 2a. edición. Ed. Interamericana México, D.F., (1986) 696-717.
30. S. AHUJA. Optimization of selectivity, detectability and analysis time in high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., vol. 499 (1990) 489-498.
31. M. GAZDAG, G. SZEPESI. Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis IV. Selection of most applicable separation system. J. Chromatogr., vol. 464 (1989) 279-288.
32. Y. HAYASHI, R. MATSUDA. Information Theory of Optimization in Chromatography: Equivalence Relation of Chromatograms. J. Chromatogr. Sci., vol. 29, February (1991) 60-65.
33. A. L. BERDICHEVSKY, U. D. NEUE. Nature of the eddy dispersion in packed beds. J. of Chromatogr., 535 (1990) 189-198.

34. M. MILLER. Chromatography: Concepts and contrasts. Wiley interscience. USA., (1988) 25-108.
35. R. BROWN, HARTWICK. High Performance Liquid Chromatography. Ed. Wiley Interscience. USA, (1989) 117-143, 529-561.
36. E. KATZ. Quantitative Analysis using chromatographic techniques. Ed. John Wiley & Sons. Great Britain, (1988) 50-65.
37. J. FRANC, J. SECHOVEC. The role of hydrogen bonds in chromatography. I. Amino and hydroxyanthraquinones. J. Chromatogr., vol. 212 (1981) 139-152.
38. M. SMITH, L. MILLER. Comparison of the selectivity of cyanobonded silica stationary phases in reverse-phase liquid chromatography. J. Chromatogr., vol. 464 (1989) 297-306.
39. M. De SMET, L. MASSART. High-performance liquid chromatography of basic drugs on cyanopropyl-bonded phases: practical aspects. Trends Anal. Chem., vol. 8, no. 3 (1989) 96-101.
40. M. de SMET, G. HOOGEWIJS, M. PUTTEMANS, L. MASSART. Separation Strategy of Multicomponent mixtures by Liquid Chromatography With a Single Stationary Phase and a Limited Number of Mobile Phase Solvents. Anal. Chem., vol. 56 (1984) 2662-2670.
41. K. UNGER, J. KINKEL. Role of solvent and base in the silanization reaction of silicas for reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., vol. 316 (1984) 193-200.
42. C. SANDER. Evaluation of Column Performance in Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Sci., vol. 26, August (1988) 380-386.
43. C. HORVATH. High-performance liquid chromatography. Advances and perspectives. vol 2, Ed. Academic press. USA, (1980) 201-205.
44. M. De SMET, L. MASSART. Retention behaviour of acidic, neutral and basic drugs on a CN column using phosphate buffers in the mobile phase. J. Chromatogr., vol. 410 (1987) 77-94.

45. L. WEISER, W. SALOTTO, M. FLACH, R. SNYDER. Basis of retention in normal-phase high-performance liquid chromatography with cyano-propyl columns. J. Chromatogr., vol. 303 (1984) 1-12.

46. A. NAHUM, C. HORVATH. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. J. Chromatogr., vol. 203 (1981) 53-63.

47. J. KIEL, L. MORGAN, K. ABRAMSON. Effects of amine modifiers on retention and peak shape in reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., vol. 320 (1985) 313-323.

48. F. OTERO, N. CARDUCCI. Silanophilic interaction in the retention mechanism of pharmaceutical drugs on a cyanopropyl bonded silica column. J. Liq. Chromatogr., vol. 14 no. 8 (1991) 1561-1573.

49. M. MUIHOLLAND, R. RUDD. Development and Validation of an HPLC Assay Method for the Simultaneous Determination of Beclomethasone Dipropionate, Beclomethasone 17-Monopropionate, Beclomethasone 21-Monopropionate, and Beclomethasone in Beclomethasone Dipropionate Drug Substance. Anal. Procc., vol. 22, May (1985) 140-141.

50. GUINELINES FOR COLLABORATIVE STUDY PROCEDURES. Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. J. Assoc. off Anal. Chem., vol. 71, no. 1 (1988) 161-171.

51. E. JIMENEZ. Un acercamiento a la validación de los métodos analíticos. I Parte. Pharma News, vol 1, no. 5 (1990) 16-17.

52. J. A. ADAMOVIĆS. Chromatographic analysis of pharmaceuticals. Ed. Marcel-Dekker Inc. USA, (1990) 1-21.

53. U. AHMED, A. LAU-CAM, M. BOLTON. Factorial design in the study of the effects of selected liquid chromatographic conditions on resolution and capacity factors. J. Liq. Chromatogr., vol. 13, no. 3 (1990) 525-541.

54. L. SNYDER, L. GLAJCH, J. KIRKLAND. Theoretical basis for systematic optimization solid chromatography solvent-solute localization effects. *J. Chromatogr.*, vol. 218 (1981) 299-326.

55. J. RUNSER. Maintaining and troubleshooting HPLC Systems. Ed. Wiley Interscience, USA, (1979) 69-89.

56. D. ERICKSON, B. LAKINGS, D. DRINKWINE, L. SPIGARELLI. Quantitative analysis of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) by high-performance liquid chromatography - Thermal energy analyzer detection. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol. 36 (May/Jun 1985) 213-222.

57. L. GELBER, N. PAPAS. Validation of High-Performance Liquid Chromatographic Methods for Analysis of Sustained-Release Preparations Containing Nitroglycerin, Isosorbide Dinitrate, or Pentaerythritol Tetrantrate. *J. Pharm. Sci.*, vol. 72, no. 2 (1983) 124-126.

58. E. SKELLY, W. BARR, P. ZELINKO. Computer assisted standard selection for reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, vol. 535 (1990) 199-205.

59. L. INMAN, K. FRISCHMANN, J. JIMENEZ, D. WINKEL, L. PERSINGER, S. RUTHERFORD. General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples. *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 25, June (1987) 252-256.

60. COMITE DE ELABORACION DE GUIAS OFICIALES DE VALIDACION DE LA DIRECCION GENERAL DE CONTROL DE INSUMOS PARA LA SALUD, SSA. Validación de métodos analíticos. México, D.F., (1990) 73 p.p.

61. T. LOFTUS. Pharmaceutical Process Validation. Ed. Marcel Dekker Inc. USA., (1984) 31-49.

62. S. EBEL. Validation of analysis methods. *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 342 (1992) 769-778.

63. L. CAVEMAGHI, G. GALLO, M. LEALT, S. VIANELLO. Statistical evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control of medicines. *Drug Develop Industr. Pharmacy.*, vol. 13, no. 14 (1987) 2571-2615.

64. L. LEE, M. TAYLOR, J. KANTROWITZ. Statical Evaluation of Quality Control Tests. *Phar. Technol.*, September (1988) 108-120.

65. W. SNEDECOR. Métodos estadísticos. Ed. CECSA, México, D.F., (1984) 467-515.

66. T. WERNIMONT, W. SPENDLEY. Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. Ed. AOAC, USA, (1990) 132-137.

67. D. HINCHEN. Estadística práctica para la investigación química. Ed. El Manual Moderno. México, D.F., (1976) 1-53.