



72
Zej
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"Desarrollo y Validación de un Método Analítico
por Clar para Cuantificar Naproxeno y
Paracetamol en Suspensión"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
Rocío Mejía Vázquez



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE : PROF. ALFREDO GARZON SERRA

VOCAL : PROF. HELGI HELEN JUNG COOK

SECRETARIO : PROF. CONSUELO ARELLANO BARAJAS

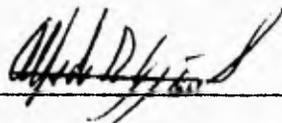
1er. SUPLENTE : PROF. NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON

2do. SUPLENTE : PROF. SOFIA MARGARITA RODRIGUEZ ALVARADO

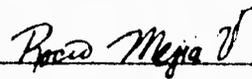
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
LABORATORIOS LIOMONT S.A. de C.V.
Departamento de Desarrollo y Tecnologia
Av. Adolfo Lopez Mateos No. 68
Col. Cuajimalpa

ASESOR

SUSTENTANTE



Q.F.B. ALFREDO GARZON SERRA



ROCIO MEJIA VAZQUEZ.

Agradecimientos

Agradezco a los Laboratorios Liomont, en especial al departamento de Desarrollo Analítico por las facilidades otorgadas en la elaboración de esta Tesis.

Al QFB Alfredo Garzón Serra

por su ayuda brindada en la realización y revisión de esta tesis.

A la QFB Amelia Niebla Perez

porque gracias a ella se pudo llevar a término el desarrollo de esta tesis.

Dedicatorias

A mis padres Teresa y Pedro

con todo mi amor, respeto y agradecimiento.

A mi mamá :

por toda una vida de esfuerzo dedicado a nosotros.

Eres la mejor. Gracias mamá.

A mis queridos hermanos :

Hector, Diana y Marina

A Lupita y Alicia

por ser excelentes compañeras y amigas. Gracias.

A mis amigas de siempre.

Martha, Margarita y Rita.

Con cariño a mis amigas

Delia, Eugenia y Graciela.

A Ricardo, por ser como eres y

porque siempre serás, lo mejor de mi vida.

CONTENIDO

CAPITULO UNO

Introducción	1
------------------------	---

CAPITULO DOS

Generalidades

2.1	Fármacos analgésicos antipiréticos	3
2.2	Acetaminofén.	
2.2.1.	Monografía	5
2.2.2.	Métodos de análisis	7
2.2.3.	Propiedades farmacológicas	8
2.3	Naproxén.	
2.3.1.	Monografía	10
2.3.2.	Métodos de análisis	12
2.3.3.	Propiedades farmacológicas	13
2.4	Cromatografía de líquidos de alta resolución	
2.4.1.	Conceptos básicos	16
2.4.2.	Tipos de CLAR	21
2.4.3.	Equipo.	23
2.5	Validación de métodos analíticos	27

CAPITULO TRES

Parte experimental

3.1	Material, reactivos y equipo.	38
3.2	Selección de las condiciones cromatográficas.	39
3.3	Desarrollo del Método Analítico	39
	3.3.1 Condiciones del Método cromatográfico	43
3.4	Validación del Método Analítico	44

CAPITULO CUATRO

Resultados Experimentales

4.1	Selección de las condiciones cromatográficas.	47
	4.1.1. Selección de la fase móvil	47
4.2	Validación del Método Analítico	
	4.2.1. Especificidad	54
	4.2.2 Linealidad	63
	4.2.3. Exactitud	71
	4.2.4. Precisión.	73
	4.2.5 Tolerancia del sistema	77
	4.2.6 Estabilidad de la muestra	83
4.3	Metodología analítica	84

CAPTULO CINCO

Conclusiones	86
Propuestas.	87
BIBLIOGRAFIA	88

CAPITULO I

INTRODUCCION

Con la finalidad de **obtener** medicamentos más efectivos, o bien **tratar** otros padecimientos presentes al mismo tiempo en el enfermo, los laboratorios farmacéuticos, se ven en la necesidad de **desarrollar** medicamentos que contienen combinación de varios principios activos.

Esto condujo al desarrollo de una nueva formulación en la cual se combinan el naproxén, (uno de los principales antiinflamatorios no esteroideos), con el paracetamol, (el cual tiene propiedades semejantes), para **aumentar** el poder analgésico y antipirético del medicamento en la forma farmacéutica de polvo para reconstituir .

Una parte importante en el **desarrollo** de nuevos productos, es el desarrollo y validación de técnicas analíticas que permitan **identificar** y **cuantificar** a los fármacos en estudio, permitiendo conocer como se comportan durante el desarrollo de la formulación, la fabricación, estudios de estabilidad, almacenamiento, hasta su administración, y de esta forma, asegurar que el medicamento tenga la **efectividad** terapéutica para la cual fue creado.

En consecuencia, se cuenta con diversos metodos analíticos de acuerdo a las diferentes necesidades de análisis (**métodos** analíticos empleados en estudios de estabilidad, biodisponibilidad, así como para **el** control de calidad del producto).

Actualmente, las técnicas **romatográficas** son el recurso analítico más importante con **el** que se cuenta para la separación, identificación y cuantificación de una amplia variedad de sustancias.

El presente trabajo involucra el **desarrollo** de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para **cuantificar** Paracetamol y Naproxén en una suspensión oral.

CAPITULO I INTRODUCCION 2

El método desarrollado es adecuado para el control de calidad del producto antes y después de su reconstitución y además para cuantificar los principios activos durante el estudio de estabilidad.

El método demostró ser adecuado para el producto farmacéutico, al aplicarle el proceso de validación, que es la comprobación documentada de la efectividad y reproducibilidad de la metodología para proporcionar resultados analíticos confiables.

CAPITULO II

GENERALIDADES.

II.1. FARMACOS ANALGESICOS ANTIPIRETICOS.^(13,27)

La clasificación de los analgésicos se basa por la severidad del dolor que los mismos son capaces de aliviar.

Los analgésicos fuertes se usan para aliviar desde un dolor moderado a un dolor fuerte, y los analgésicos benignos, se usan para aliviar de dolor benigno a dolor moderado.

Dentro de los analgésicos fuertes se encuentran:

- a) Narcóticos.- Producen dependencia. Tipo morfina y sus derivados.
- b) No narcóticos.- Pentazocina que es un derivado del benzomorfolo y la metotrimoprina que es un derivado de la fenotiazina.

Dentro de los analgésicos benignos se encuentran:

- a) Relacionados químicamente a los analgésicos fuertes como codeína y propoxifeno.
- b) Antipiréticos.- El prototipo es la aspirina.

Los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos son un grupo heterogéneo de compuestos, a menudo sin relación química (aunque casi todos son ácidos orgánicos), pero que comparten algunas acciones terapéuticas y efectos secundarios. Su prototipo, como ya se había mencionado anteriormente, es la aspirina y por eso se denomina a menudo a estos compuestos, fármacos tipo aspirina.

Dentro de este grupo, existen cuatro clases basadas en su estructura química y son:

- 1) Salicilatos.
- 2) Derivados del para-aminofenol.

CAPITULO II. GENERALIDADES 4

3) Derivados de la Pirazolona.

4) Agentes no relacionados químicamente.

El paracetamol pertenece a la segunda clase de compuestos y es útil como analgésico y antipirético, alternativo del ácido acetilsalicílico en pacientes seleccionados, pero a diferencia de éste, su actividad antiinflamatoria es débil.

En la clase de agentes no relacionados químicamente se encuentra el naproxén, que es una sustancia antiinflamatoria no esteroide, analgésica y antipirética.

II.2. ACETAMINOFEN.

II.2.1. MONOGRAFIA

II.2.1.1. Propiedades.^(4,10,22)

El acetaminofén es extensamente usado como analgésico y antipirético alternativo de la aspirina en pacientes seleccionados (casos de úlcera péptica, gota, hemofilia, etc), cuando existe dolor leve o moderado en cefaleas, mialgias, artralgias y en el postoperatorio; también en pacientes con cuadros febriles de diversa etiología.

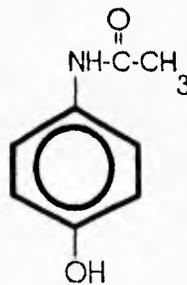
II.2.1.2. Descripción

Nombres químicos y sinónimos.

N-(4-hidroxifenil) acetamida; 4'-hidroxiacetanilida; p-hidroxi-acetanilida;

p-acetaminofenol; N-acetil-p-aminofenol; p-acetilaminofenol; paracetamol.

Fórmula desarrollada:



CAPITULO II. GENERALIDADES 6

Fórmula condensada: $C_8H_9NO_2$

Peso molecular: 151.16

Descripción: Polvo blanco cristalino o cristales blancos, inoloro, con sabor amargo .

Solubilidad: 1 en 70 de agua, 1 en 20 de agua hirviendo, 1 en 7 de alcohol (95%), 1 en 13 de acetona, 1 en 9 de propilenglicol, muy poco soluble en cloroformo, prácticamente insoluble en benceno y éter, y soluble en soluciones de hidróxidos de álcali. Una solución saturada en agua tiene un pH de aproximadamente 6.

pKa = 9.51

Punto de fusión: 168° a 172°C.

Espectro de UV: El espectro UV del paracetamol en metanol presenta un máximo de absorbancia a 249 nm. (E 1%, 1 cm = 900).

II.2.2. METODOS DE ANALISIS. ^(4,10,24)

II.2.2.1. Titulación no acuosa.

La valoración del paracetamol indicada por el Florey, se lleva a cabo en dimetilformamida, determinándose el punto de equivalencia con hidróxido de tetrabutilamonio.

II.2.2.2. Método colorimétrico.

a) El método colorimétrico reportado en el Clarke, se basa en la hidrólisis del paracetamol con HCl concentrado para hacerlo reaccionar posteriormente con solución 0.1 N de dicromato de potasio, desarrollándose una coloración ligeramente violeta.

b) Al adicionar una gota de cloruro férrico a una solución etanólica del compuesto se desarrolla un color violeta azulado.

II.2.2.3. Método espectrofotométrico.

El espectro UV del paracetamol en metanol presenta un máximo de absorbancia a 249 nm.

(E 1%, 1 cm = 900).

II.2.2.4. Cromatografía en capa delgada.

La CCD ha sido usada como método de valoración e identificación del paracetamol. Symonds y Dedicoat (24) reportaron la identificación del compuesto empleando este método. El paracetamol fué extraído con cloroformo y separado empleando una placa de sílica gel (Kodak 6061), activada previamente a 105^o C por 30 min y empleando como fase móvil cloroformo-isopropanol (19:5). El cromatograma fue revelado rociando una solución de ácido molibdofosfórico (Rf=0.40).

II.2.3. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.⁽²²⁾

II.2.3.1. Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción del paracetamol, que explica satisfactoriamente su eficacia como analgésico antipirético, no se conoce. Existen evidencias de que inhibe en forma mínima la biosíntesis de prostaglandinas en el SNC y un poco menos en la periferia, estos hechos podrían constituir una explicación parcial de la disminución de la fiebre y del efecto analgésico que produce este fármaco.

II.2.3.2. Absorción, metabolismo y excreción.

Después de la administración oral de una dosis terapéutica, la concentración plasmática máxima es de 5-20 mg/ml en 30-60 min y la fijación a las proteínas del plasma es mínima; la vía rectal no ofrece datos confiables de biodisponibilidad ya que la absorción es muy variable. La vida media biológica varía entre 1-3 h, se distribuye en todos los líquidos corporales y se elimina en la orina en 24 hr. Su biotransformación se lleva a cabo en el hígado mediante reacciones de síntesis o conjugación y sólo en mínima parte por oxidación. En caso de disminuir la conjugación, las oxidaciones pueden aumentar dando lugar a metabolitos tóxicos.

II.2.3.3. REACCIONES ADVERSAS.

Raramente produce hipersensibilidad. Se ha observado necrosis hepática e insuficiencia renal aguda relacionadas con sobredosis del fármaco. La hepatotoxicidad puede precipitar ictericia, trastornos de la coagulación, coma y muerte. Los síntomas iniciales son náusea, vómito, anorexia y dolor abdominal; sin embargo, no reflejan la gravedad de la intoxicación. En este caso debe limitarse la absorción lo más rápidamente, (inducción del vómito, lavado gástrico, administración oral de carbón activado). Resulta promisorio la administración de N-acetilcisteína que, por ser precursor de glutatión, limita indirectamente la toxicidad de los metabolitos que al parecer son responsables del daño tisular (al aumentar el glutatión disponible, intracelular, se restablece la ruta de biotransformación que inactiva al fármaco).

II.3. NAPROXEN

II.3.1. MONOGRAFIA.

II.3.1.1. Propiedades⁽¹⁷⁾

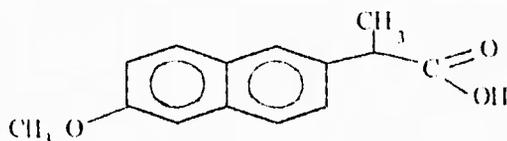
Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE) se encuentran en un lugar preponderante dentro de la terapéutica por sus propiedades antiinflamatorias en el tratamiento sintomático de la artritis reumatoide, así como también por sus efectos analgésicos y antipiréticos. Dentro de este grupo, han tenido especial éxito los derivados del ácido propiónico, tales como el naproxén el cual es un potente FAINE con propiedades analgésicas y antipiréticas.

II.3.1.2. Descripción.

Nombres químicos y sinónimos.

Acido 6-metoxi-alfa-metil-2-naftaleno-acético; ácido d-2-(6 metoxi-2-naftil)- propiónico; naxén.

Fórmula desarrollada:



CAPITULO II. GENERALIDADES 11

Fórmula Condensada: $C_{14}H_{14}O_3$

Peso molecular: 230.26

Descripción: Es una sustancia cristalina, inodora de color blanco a blancuzco.

Solubilidad: Es casi insoluble en agua a un pH bajo, pero es libremente soluble a un pH elevado. Soluble 1 en 25 de alcohol, 1 en 15 de cloroformo, 1 en 40 de éter y 1 en 20 de alcohol metílico.

pKa : 4.2.

Punto de fusión: 156°C.

Espectro de absorcion UV: El espectro del naproxén en etanol presenta un máximo de absorbanca a 271 nm.

II.3.2. METODOS DE ANALISIS.⁽²⁷⁾

II.3.2.1. Método volumétrico.

El naproxén es un compuesto que está formado por un grupo carboxilo, que puede servir para determinarlo cuantitativamente por este método, utilizando como agente valorante una base fuerte como el hidróxido de sodio. Para determinar el punto final de la valoración se utiliza fenolftaleína como solución indicadora.

II.3.2.2. Método colorimétrico.

El naproxén produce una reacción colorida al convertir su grupo carboxilo en hidroxamato férrico. La determinación se basa en la reacción de la hidroxilamina con naproxén en medio alcalino, a una temperatura de 70°C, formando ácido hidroxámico. Este reacciona con el ión férrico formando un complejo color rojo-violeta, el cual tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 530 nm.

II.3.2.3. Método potenciométrico.

Este método se basa en la medición del potencial de una molécula a través de una titulación. La variación en el potencial es usada para localizar el punto final llamado punto de equivalencia, indicado por el cambio brusco producido al final de la reacción. La valoración del naproxén se lleva a cabo en alcohol titulando con solución 0.1 N de hidróxido de sodio, determinando el punto de equivalencia potenciométricamente.

II.3.2.4. Método espectrofotométrico.

El espectro del naproxén en etanol presenta un máximo de absorbancia a 271 nm.

II.3.3. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS. ^(13,17)

II.3.3.1. Mecanismo de acción

El naproxén es un agente no esteroide, que exhibe notables propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas.

Igual que con otros FAINE, su mecanismo preciso de acción todavía no ha sido establecido. Las opiniones actuales sostienen que su eficacia terapéutica está basada en su potente inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

II.3.3.2. Absorción, metabolismo y excreción

El naproxén se absorbe con rapidez y de forma prácticamente completa cuando se toma por vía oral. La rapidez, pero no el grado de absorción, depende de la presencia de alimentos en el estómago.

La concentración plasmática máxima se produce en 2 a 4 h y puede acelerarse con la administración de naproxén sódico. Las concentraciones séricas de naproxén aumentan en proporción directa a la dosis administrada hasta 500 mg, siendo la respuesta casi lineal. Con dosis mayores, sin embargo, la curva dosis-respuesta muestra un efecto de nivelación, y las dosis subsecuentes producen respuestas que no son proporcionales a las concentraciones séricas. Además, conforme aumentan las concentraciones séricas, también lo hacen las tasas de eliminación y excreción.

La absorción puede acelerarse con la administración simultánea de bicarbonato de sodio, o reducirse con óxido de magnesio ó hidróxido de aluminio. El efecto de los antiácidos sobre la absorción de naproxén no es uniforme, variando con el antiácido de que se trate.

El naproxén se absorbe también rectalmente, pero las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan más lentamente.

La vida media del naproxén en el plasma es de alrededor de 14 hr.

CAPITULO II. GENERALIDADES 14

Sufre biotransformación hepática, al menos el 50% es eliminado vía metabolismo de primer paso.

El naproxén y sus metabolitos se excretan casi totalmente por la orina. Aproximadamente el 30% del fármaco sufre 6-demetilación, y casi todo el metabolito se excreta principalmente como glucorónido u otros conjugados. El 6-demetilnaproxén es el único metabolito de naproxén detectado en el hombre.

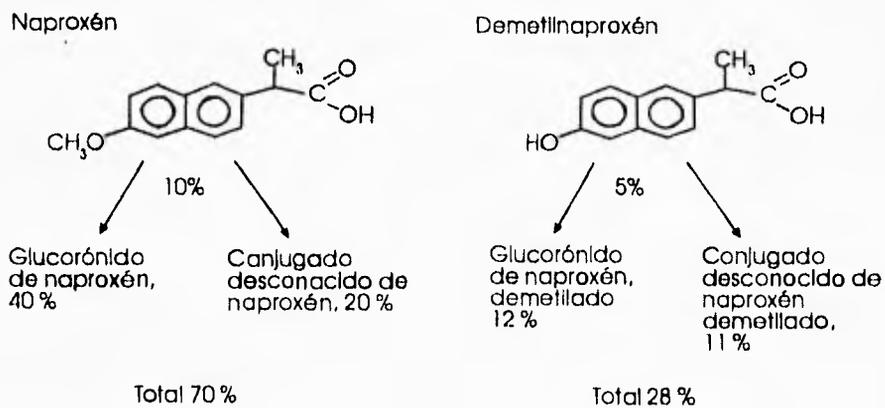


Fig.1.- Metabolitos del naproxén en el hombre.

II.3.3.3. REACCIONES ADVERSAS.⁽¹⁷⁾

En dosis relativamente **altas**, el naproxén ha sido bien tolerado por la mayoría de los pacientes, tanto en el **tratamiento a corto como a largo plazo**. Los efectos secundarios reportados más comúnmente **están** relacionados con el tracto gastrointestinal (GI), mientras que los **efectos secundarios asociados** con el sistema nervioso central (SNC) han sido encontrados con menor frecuencia. Los síntomas gastrointestinales asociados con **naproxén** han sido indigestión, náusea, **plrosis** y malestar o dolor abdominal. Los efectos secundarios asociados con el sistema nervioso central son **cefalea**, vértigo o aturdimiento, incapacidad para concentrarse, y somnolencia, con reportes ocasionales de sudoración, depresión, y trastornos auditivos.

II.4. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

2.4.1. Conceptos básicos.^(6,7)

2.4.1.1. Cromatografía

La cromatografía es básicamente un método físico de separación, en el cual, los componentes de una muestra son separados de otros por un proceso dinámico de migración diferencial, como resultado de los diferentes equilibrios de distribución de los componentes entre dos fases inmiscibles, una de ellas fija (fase estacionaria), y la otra móvil (fase móvil).

El proceso cromatográfico ocurre como consecuencia de actos repetidos de adsorción/desadsorción que ocurren durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la columna cromatográfica (fase estacionaria), y la separación es debida a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes individuales de la muestra.

En la fase móvil, las sustancias individuales exhiben diferencias de movilidad, por causa de las diferencias de solubilidad, partición, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las fuerzas de retención por parte de la fase estacionaria pueden ser por adsorción como en el caso de adsorbentes tales como alúmina activada, sílica gel, y resinas de intercambio iónico; o pueden actuar disolviendo el soluto y distribuyéndolo entre las fases estacionaria y móvil. Todo ello ocasiona que los solutos salgan de la columna separados.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, a diferencia de otros métodos cromatográficos, ofrece una gran eficiencia de separación, transformando una columna de cromatografía líquida en una de alta velocidad, gracias a un sistema que consta de varios componentes que han sido diseñados para optimizar la separación.

La técnica cromatográfica puede ser resumida como sigue:

Se introduce un pequeño volumen de muestra a ser analizado, con ayuda de un inyector hacia la fase móvil que se encuentra fluyendo hacia la columna. Esto se logra, ya que el sistema cromatográfico cuenta con un sistema de bombeo que maneja un intervalo de presiones que generan velocidades óptimas de flujo de solventes para que atraviesen la columna y lleven a cabo la separación de los solutos de una muestra, en un tiempo determinado. De esta forma el tiempo de análisis se reduce, al aumentar la velocidad con que el solvente pasa a través de la columna.

Una vez que los componentes se separan en la columna y salen de ésta, son conducidos a un detector (conectado en línea), el cual efectúa un monitoreo de las mismas. Las señales generadas son analizadas en un procesador de datos y registradas, posteriormente, en un cromatograma, en forma de picos de aspecto gaussiano. El área y la altura del pico son proporcionales a la cantidad de soluto.

De esta forma, la información es fácilmente extraída y proporciona: a) La complejidad de la muestra basada en el número de picos observados; b) Identificación cualitativa de los componentes de la muestra, basados en la determinación exacta de la posición de los picos, c) Evaluación cuantitativa de la concentración relativa de los picos o cantidad de cada pico y d) Indicio del funcionamiento de la columna.

La información fundamental del proceso cromatográfico se trata más adelante.

II.4.1.2. Cromatograma.^(1,2,3)

La información resultante obtenida del experimento cromatográfico, es contenida en un cromatograma y se presenta como un gráfico de la concentración de los componentes de la muestra en función del movimiento de la fase móvil.

Idealmente, un pico cromatográfico tiene forma Gaussiana

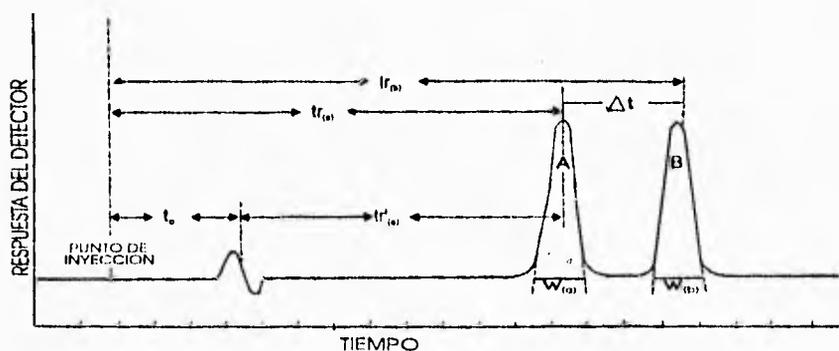


Fig.2.- Cromatograma

Esta forma puede explicarse en términos de las propiedades físicas y químicas. La muestra se ha retardado en virtud de su solubilidad en la fase líquida y su perfil ha sido modificado por varios procesos, tales como la difusión longitudinal de las moléculas de soluto en la fase móvil y efectos de adsorción en la fase estacionaria. Si este equilibrio de distribución en ambas fases, permanece inalterado por cambios en la concentración del soluto se genera una isoterma de adsorción lineal, dando como resultado una distribución simétrica del soluto en el efluente de la columna.

El modelo Gaussiano solo es apropiado cuando el grado de asimetría del pico es muy pequeño. La información cromatográfica es usada para cuantificar la cantidad de cualquier soluto de interés en una muestra.

CAPITULO II. GENERALIDADES 19

II.4.1.3. TERMINOS USADOS EN CROMATOGRAFIA. ^(19,21,23,28)

Algunos de los términos empleados en cromatografía y los parámetros que hay que considerar para que se lleve a cabo una buena separación cromatográfica se presentan a continuación:

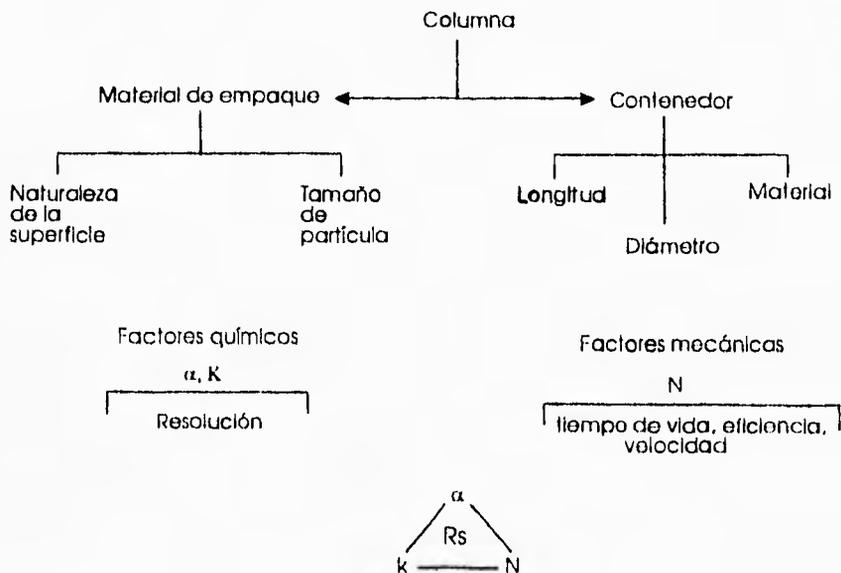
Término	Símbolo	Definición	VARIABLES QUE LO CONTROLAN
Tiempo muerto	t_m	Es el tiempo requerido por un compuesto inerte para migrar desde su entrada a la salida de la columna sin que haya sido retenido por la fase estacionaria.	Físicamente este volumen representa los espacios intersticiales entre las partículas empacadas en la columna y algunos poros fácilmente accesibles en el material de empaque. Estos espacios están ocupados por la fase móvil, por lo que este parámetro depende del tipo de material y empaque de la columna.
Tiempo de retención	t_r	Es el tiempo necesario por un compuesto, para migrar desde el punto de inyección de la muestra al término de la columna (detector)	Depende de la composición del eluente y de la fase estacionaria, velocidad de flujo, temperatura, y el tipo de muestra.
No de platos teóricos	N	Es una medida de la eficiencia de la columna que refleja su capacidad separadora	N, depende de la longitud de la columna, diámetro de partícula y velocidad de flujo de la fase móvil.
Retención relativa	α	Es la separación entre dos componentes o factor de separación. Esta es una función de las relativas interacciones fisicoquímicas de los solutos con las dos fases.	Es una función de la superficie cromatográfica, la naturaleza de los componentes de la fase móvil y la temperatura y es independiente del tipo de columna y sus dimensiones
Factor de capacidad	k	Es la razón del tiempo que pasa el soluto en la fase estacionaria entre el tiempo que pasa en la fase móvil.	El factor de capacidad es afectado por la composición del solvente, la fase estacionaria y la temperatura a la cual ocurre la separación.

CAPITULO II. GENERALIDADES 20

Resolución	R_s	Da el grado de separación entre dos picos. Es definida como la diferencia en los t_r de dos picos dividido por la mitad del ancho de los picos en la base, expresada en unidades de tiempo.	La R_s puede ser mejorada, incrementando los valores de N , K y α . Así puede ser incrementada, disminuyendo el tamaño de partícula, incrementando la longitud de la columna ó incrementando la retención de los compuestos de interés.
Altura equivalente a un plato teórico	h	Es una sección de una columna, en la cual la fase móvil y la fase estacionaria están en equilibrio. El valor de h es un criterio de calidad de la columna	Esta en función de la velocidad de flujo de la fase móvil, la difusión longitudinal y la transferencia de masa hacia la fase móvil.

Cuadro 1.- Términos empleados en cromatografía y sus definiciones.

La columna cromatográfica y sus componentes, contribuyen a la Resolución cromatografica como a continuación se esquematiza:



II.4.2. TIPOS DE CLAR. ^(20,23)

La flexibilidad de las separaciones por cromatografía de líquidos de alta eficiencia se debe principalmente a las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra y las dos fases: móvil y estacionaria, lo cual ha permitido el desarrollo de una gran variedad de técnicas.

Las diferentes técnicas de cromatografía líquida son:

- Cromatografía de adsorción
- Cromatografía de partición
 - a) Modalidad fase Normal.
 - b) Modalidad fase Reversa.
- Cromatografía de pares de iones
- Cromatografía de intercambio iónico y
- Cromatografía de exclusión

Cada uno de los tipos de cromatografía se aplica dependiendo del compuesto por separar.

En el siguiente cuadro, se presentan las características de cada uno de los tipos de cromatografía y sus aplicaciones.

CAPITULO II. GENERALIDADES 22

Tipos de cromatografía	Fundamento	Aplicaciones
Cromatografía de adsorción.	Esta basada principalmente en la diferente afinidad relativa de los compuestos por el adsorbente sólido usado como fase estacionaria.	Algunos de los sólidos más usados son: sílica gel para separar muestras ácidas o neutras y alumina para separar compuestos básicos.
Cromatografía de partición ó Cromatografía líquido-líquido (CLL).	En la CLL las moléculas de soluto son distribuidas entre dos líquidos inmiscibles, de acuerdo a sus solubilidades relativas. Un líquido es la fase móvil y el otro es la fase estacionaria, que es un líquido disperso en un soporte poroso, usualmente inerte. De este modo la muestra es separada de acuerdo a su coeficiente de partición entre fase móvil y la estacionaria.	Se pueden emplear dos modalidades: - Fase normal - Fase reversa
Cromatografía de partición en Fase Normal.	Donde la fase estacionaria es más polar que la fase móvil.	Es utilizada para separar compuestos polares; ejemplos: fenoles, aminas y compuestos heterocíclicos.
Cromatografía de partición en Fase Reversa.	La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se utiliza una fase orgánica que está adherida químicamente al soporte y la fase móvil es de carácter polar.	Se aplica a compuestos no polares; ejemplos: esteroides y compuestos hidrocarbonados.
Cromatografía de pares de iones	Se basa en la formación de pares iónicos entre un soluto y una sal. Esta se encuentra en la fase móvil y se denomina como formador de pares iónicos.	Se aplica a muestras de naturaleza polar, tales como bases, ácidos, iones compuestos con varios grupos ionizables, ej.: antibióticos, antipiréticos, y vitaminas hidrosolubles.
Cromatografía de Intercambio iónico.	Esta basada en la diferente afinidad de iones en solución por sitios de polaridad opuesta en la fase estacionaria.	Se utiliza para separar muestras iónicas o ionizables y a compuestos con intervalos de peso molecular muy amplios, ejemplo: péptidos y aminoácidos
Cromatografía de exclusión	Separa las moléculas de acuerdo a el tamaño y forma molecular de los componentes de la muestra en solución, usando una columna empacada con partículas de aproximadamente el mismo tamaño y totalmente porosas, con poros de diámetro definido.	Es utilizada cuando en la muestra se encuentran compuestos de diferente tamaño molecular. El orden de elución será primero, las moléculas de gran tamaño, después las de tamaño intermedio y por último las pequeñas.

Cuadro 2. - Tipos de cromatografía y sus aplicaciones .

II.4.3. EQUIPO. ^(9, 19, 20, 21, 23)

El equipo utilizado en Cromatografía de Líquidos debe cubrir los siguientes requisitos.

Debe ser:

a) Versátil.

El instrumento debe ser **apto** para resolver y trabajar con muestras de diferentes tipos, utilizando las diversas técnicas cromatográficas realizando el máximo de operaciones, tales como la programación de fase móvil, operar a diferentes longitudes de onda, etc.

b) Reproducible.

El sistema debe ser **capaz** de controlar los diferentes parámetros operacionales, que permitan obtener un control **preciso** de temperatura de la columna, composición de la fase móvil, velocidad de flujo y **respuesta** del detector.

c) Rápido.

El equipo debe poseer columnas altamente eficientes, alta velocidad de fase móvil y una elevada capacidad de manejo de datos. Esto depende de las bombas de alta presión empleadas, un volumen muerto mínimo, un registrador veloz y un procesador automático.

d) Sensible.

Un buen instrumento, **además** de trabajar con pequeñas cantidades de muestra debe generar señales de intensidad **apreciables**. La sensibilidad depende del diseño cuidadoso del detector para dar una buena razón de señal-ruido, y de columnas eficaces.

CAPITULO II. GENERALIDADES 24

El cromatógrafo es un instrumento complejo el cual está constituido por varios componentes que operan conjuntamente. Las partes fundamentales de que consta un equipo para CLAR son:

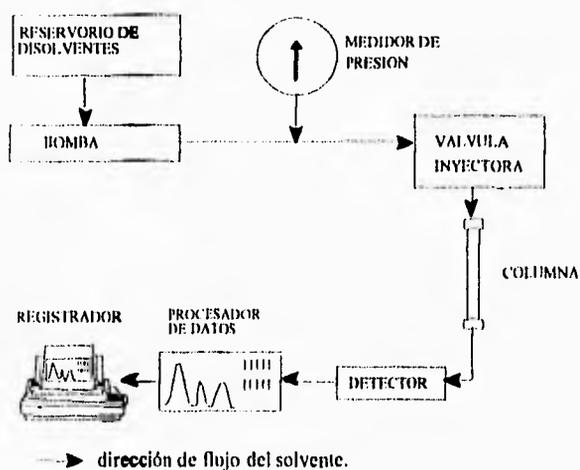


Fig. 3.- Componentes del equipo que constituyen el sistema cromatográfico.

CAPITULO II. GENERALIDADES 25

EQUIPO	FUNCION	CARACTERISTICAS	CLASIFICACION
Inyector	Es el mecanismo utilizado para introducir la muestra hacia el sistema cromatográfico de tal forma que no se difunda demasiado a la entrada de la columna, para permitir que exista buena separación.	Debe resistir altas presiones y estar construido de un material que pueda ser lavado completamente por la fase móvil, de tal manera que en la siguiente inyección no exista contaminación con residuos de la inyección anterior. Además, debe introducir la muestra de forma rápida y reproducible.	<ul style="list-style-type: none"> - Inyector manual utilizando una jeringa. Esta tiene que soportar grandes presiones, aunque el sistema cuente con ciertos dispositivos que desvían el flujo de solvente (o bien lo suspenden) mientras se introduce la muestra. - Inyector automático. Este mantiene la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar.
Columna	El corazón de un sistema de CLAR es la columna. En ella se realiza la separación de cada uno de los componentes de una muestra determinada.	En general, se utilizan columnas de acero inoxidable de longitud 5-30 cm. Al aumentar la longitud aumenta el No. de platos teóricos y, por lo tanto, se obtiene una mayor resolución. La columna debe estar compuesta de materiales microparticulados (≤ 10 mm) uniformemente empacados, de tamaño de partícula uniforme (al aumentar el área de superficie, aumenta la interacción del soluto con la fase orgánica).	Los tipos de empaque utilizados normalmente en fase normal son sílica y alúmina. En fase reversa se utilizan soportes sólidos adecuados enlazados covalentemente a diferentes grupos funcionales (ejemplos: C_6 , C_{18} , fenil, CN, NH_2)
Detector	Un detector en CLAR se define como un instrumento cuidadosamente diseñado, a través del cual la solución que fluye desde la columna del cromatografo genera, en la mayoría de los casos, una señal continua de salida eléctrica, que esta en función de la concentración del analito en la fase móvil.	Las características deseables de un detector en línea incluyen: estabilidad (bajos niveles de ruido y variaciones en la velocidad de flujo), alta sensibilidad para diferentes clases de compuestos, amplio rango dinámico, velocidad de respuesta rápida, mínimo volumen muerto, no destructivo, y preferiblemente, insensible a cambios en la velocidad de flujo y composición de la fase móvil.	Los detectores pueden ser clasificados de la siguiente manera de acuerdo al tipo de respuesta generada: <ul style="list-style-type: none"> a) Detectores Universales, que acusan cambios en una propiedad física a medir, propia en principio, para todo tipo de moléculas. b) Detectores selectivos, cuya filosofía es opuesta a la del tipo anterior, detectando una muy limitada serie de compuestos o grupos funcionales. c) Detectores específicos, que solo pueden responder a un muy limitado grupo de moléculas.

CAPITULO II. GENERALIDADES 26

<p>Bomba</p>	<p>Para realizar un análisis por CLAR, se requiere disponer de una bomba de líquidos que proporcione altas presiones, necesaria para que la fase móvil pueda atravesar la columna cromatográfica.</p>	<p>La bomba debe hacer pasar el solvente a través de la columna, de forma precisa, reproducible y con un flujo libre de pulsos, a presiones que pueden abarcar un rango de 500 5000 psi. También necesita ser resistente a la acción química debida a las fases móviles y un bajo volumen muerto para cambios rápidos de solvente como son utilizados particularmente en los gradientes de elución.</p>	<p>Las más importantes a mencionar son: - Bombas de flujo constante: Tienen mecanismos que reducen las pulsaciones de flujo. Entre estas se encuentran: bombas de pistón; reciprocante y las de jeringa. - Bombas de presión constante: la forma más sencilla de éstas bombas emplea la presión de un gas inerte para presurizar el solvente. Estas bombas presentan ciertas desventajas: es necesario mantener la viscosidad del solvente, la temperatura de la columna y la presión constantes, además parte del gas se disuelve en el solvente y esto forma burbujas. Entre estas se cuentan con: bombas de presión directa mediante un gas; de intensificador neumático y de intensificador hidráulico.</p>
<p>Procesador de datos</p>	<p>Proporciona las medidas básicas en un cromatograma para propósitos de cuantificación e identificación del soluto.</p>	<p>Debe representar con exactitud el perfil del soluto sin distorcionarlo. Manejar varios parámetros de análisis. Realizar cálculos confiables Rápida velocidad de análisis.</p>	<p>Existen diferentes clases de procesadores. Su manejo y características particulares dependerán del tipo de software empleado.</p>
<p>Registrador</p>	<p>Tiene la función de graficar a cada componente que es eluido en forma de pico dependiendo de la concentración del soluto y del tiempo de retención.</p>	<p>Algunas características deseables de los registradores son: respuesta rápida y velocidad variable del papel.</p>	<p>Generalmente se utilizan registradores potenciométricos. Aunque actualmente se emplean diversas impresoras y plotters que registran la información proveniente del procesador de datos.</p>

Cuadro 3. Equipo empleado en la CLAR.

II.5. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS ^(5,15,16,25)

La validación de un método analítico se debe entender como el proceso mediante el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

De esta forma, al asegurar la integridad y la calidad de la metodología analítica, se cumple con una parte importante del programa integral de validación para obtener un producto con calidad diseñada.

El propósito de llevar a cabo una determinación es el de obtener un valor estimado del valor verdadero, ya que nunca se podrá conocer el valor real. Esto se debe a que ninguna medición se encuentra libre de error y lo que se está determinando es un valor que difiere del valor real con una diferencia llamada error absoluto.

Una validación adecuada de la metodología, permite conocer sobre que margen de error estamos trabajando y "controlar" dicho error.

El error total de un método puede representarse de la siguiente manera:

Error total = error sistemático + error aleatorio

1. Error sistemático (determinado).

Son aquellos que dan lugar a medidas incorrectas. Este tipo de error se puede clasificar de la siguiente manera:

a) errores instrumentales

b) errores del método

c) errores de operación

d) errores personales

2. Error aleatorio (indeterminado).

Son los que se producen mediante mediciones sucesivas efectuadas por el mismo analista en condiciones prácticamente idénticas, no es posible predecirlos o estimarlos.

CAPITULO II. GENERALIDADES 28

Para llevar a cabo la validación de un método analítico es necesario determinar los siguientes parámetros:

Linearidad

Intervalo

Exactitud

Precisión. Este parámetro es una medida del grado de repetibilidad y reproducibilidad del método analítico.

Límite de detección

Límite de cuantificación

Especificidad

Tolerancia.

El tipo de información que se requiere para la validación de un método analítico dado dependerá de la naturaleza de dicho método, por lo que los procedimientos de ensayo más comunes se han clasificado como sigue:

Categoría I.- Métodos analíticos para la cuantificación del fármaco o de los principios activos (incluyendo preservativos) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II.- Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado, incluyendo ensayos cuantitativos y prueba límite.

Categoría III.- Métodos analíticos para la determinación de las características de comportamiento del producto (p. ej. disolución o liberación de fármacos).

CAPITULO II. GENERALIDADES 29

Para cada una de estas categorías, los requisitos de validación necesarios son diferentes. La siguiente tabla enlista dichas variables.

	CATEGORIA			
	I	II		III
		Cuantitativo	Prueba límite	
Precisión	si	si	no	si
Exactitud	si	si	*	*
Límite de detección	no	no	si	*
Límite de cuantificación	no	si	no	*
Especificidad	si	si	si	*
Intervalo	si	si	*	*
Linealidad	si	si	no	*
Tolerancia	si	si	si	si

* Puede o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis particular.

LINEARIDAD

DEFINICION

La linealidad de un método analítico es su capacidad para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo.

La linealidad se expresa generalmente en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la recta ajustada (línea de regresión), calculada a partir de una relación matemática con los resultados del análisis de muestras con concentraciones variables y conocidas de la sustancia.

DETERMINACION

a) Linealidad del sistema.

1. Construir una curva de calibración empleando al menos cinco diluciones preparadas de una misma solución patrón.
2. Analizar cada nivel, al menos por duplicado para cada dilución.

b) Linealidad del método.

1. Preparar placebos adicionados con cantidades conocidas de la sustancia que incluyan la concentración teórica de la sustancia y que estén por debajo y por arriba de ésta (p.ej.: al 80%, 100% y 120% de la cantidad etiquetada)
2. Analizar cada nivel (o cada concentración), al menos por triplicado, por el método propuesto).

CALCULOS.

a) Linealidad del Sistema.

1. Calcular el coeficiente de determinación y el coeficiente de correlación.

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

2. Determinar el factor de respuesta para cada concentración de la siguiente manera: Obtener la razón entre propiedad medida sobre la concentración de la dilución patrón para cada punto de la linealidad del sistema.

3. Obtener el coeficiente de variación (C.V.) con los valores de respuesta obtenidos a todo lo largo del intervalo.

$$C.V. = \frac{D.E.}{F} \times 100$$

CAPITULO II. GENERALIDADES 31

donde:

DE = Desviación estándar del factor para cada punto de la linealidad del sistema y F:

$$F = \frac{\text{propiedad} \cdot \text{medida}}{\text{conc. de las diluciones de la solución patrón} \cdot (x)}$$

b) Linealidad del Método.

1) Calcular la pendiente (m) de la línea de regresión.

$$m = \frac{N (\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{N (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

2) Calcular el intercepto (b) de la línea de regresión

$$b = \frac{\sum y - m (\sum x)}{N}$$

3) Calcular el coeficiente de determinación (r^2)

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

CRITERIOS

a) Linealidad del Sistema

$$CV \leq 1.5\%; r \geq 0.99, r^2 \geq 0.98$$

b) Linealidad del método.

$$m \approx 1; b \approx 0; r^2 \geq 0.98; CV \leq 2\%$$

PRECISION**DEFINICION**

Grado de cercanía entre resultados analíticos individuales obtenidos al aplicar repetidamente el método a varias muestras de la misma muestra homogénea.

Dentro de la precisión, existen dos maneras de expresar ésta: Repetibilidad: es la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones.

Reproducibilidad: es la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones.

DETERMINACION.a) Precisión del Sistema.

Se determina por el análisis por sextuplicado de una misma solución estándar, correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

b) Precisión del Método.

Analizar repetidamente (mínimo por triplicado) una muestra homogénea del producto cuando menos por dos analistas en dos días diferentes (precisión como reproducibilidad).

CALCULOS NECESARIOS.

1) Determinar la media de los resultados

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

2) Determinar la desviación estándar de los resultados

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

3) Determinar el coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100$$

CRITERIOS

a) Precisión del Sistema.

$$CV \leq 1.5\%$$

b) Precisión del Método.

Dependiendo del método, los criterios pueden variar. Para métodos cromatográficos, el criterio utilizado es el coeficiente de variación y este debe ser \leq al 2%

EXACTITUD

DEFINICION

Concordancia entre un resultado analítico y el valor verdadero. La exactitud puede expresarse como el porciento de recobro de cantidades conocidas de la sustancia adicionadas a placebo de la muestra.

DETERMINACION

1. Analizar repetidamente muestras adicionadas con cantidades conocidas de la sustancia a analizar.

CALCULOS NECESARIOS

- 1) Calcular el porcentaje de recobro en cada una de las muestras.
- 2) Calcular el coeficiente de variación con estos porcentajes (mismos cálculos que para la precisión)

CRITERIO

Para métodos cromatográficos, se debe obtener un recobro del 98-102% y un CV (%) ≤ 2

ESPECIFICIDAD

DEFINICION

Capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente la sustancia de interés en presencia de otros componentes de la muestra.

DETERMINACION

La prueba de especificidad se realiza de acuerdo a su aplicación.

ESPECIFICIDAD PARA METODOS DE CONTROL DE CALIDAD

Con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar y diferenciar la(s) respuesta(s) del(los) activo(s) y, si es posible, de los excipientes.
3. En métodos cromatográficos, hacer una corrida de la fase móvil antes de iniciar el análisis.

ESPECIFICIDAD PARA METODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD

En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras con placebo "añadido" de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones. La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida por lo menos en un 25% con respecto a la original.

CAPITULO II. GENERALIDADES 35

Es importante que el químico que realice la prueba investigue previamente las características fisicoquímicas del producto que va a analizar para seleccionar aquellas condiciones que le proporcionen resultados adecuados.

Se sugieren las siguientes condiciones para degradar la sustancia:

1. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70°C-120°C o a 20°C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un número de días apropiado (2 a 4 semanas).
2. Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz UV o a la luz fluorescente y/o humedad.
3. Si es necesario, hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1 a 2 y/o a 10 a 12 y colocarlas a 60°C-80°C durante 2-4 semanas.
4. Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer 2 a 4 semanas a temperatura ambiente; y/o por hidrólisis (pH 1 a 2 y 10 a 12), colocando las muestras a 60°C-80°C durante 2-4 semanas.

CRITERIO

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

TOLERANCIA

DEFINICION

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones de operación como diferentes temperaturas, columnas, lotes de reactivos, empaques, etc.

DETERMINACION

1. Variar el pH normal de trabajo. Esto considerando las condiciones de trabajo (ejemplo: precisión del potenciómetro empleado para ajustar el pH)
2. Variar la proporción de modificador orgánico en la fase móvil, considerando las condiciones de trabajo (ejemplo: variación en la composición de la fase móvil debidas a error de medida de la probeta, variación de la temperatura del cuarto de trabajo)
3. Si la fase móvil es una mezcla compleja, manejar combinaciones diferentes de los componentes.
4. Determinar con regular periodicidad la EFICIENCIA de la columna durante el desarrollo y validación del método analítico propuesto.

Finalmente en un estudio por duplicado comparar la eficiencia de la columna en uso con otra que en términos generales tenga un 30% de menor eficiencia.

CALCULOS

1. Calcular factor de capacidad (k'), selectividad (alfa), resolución y simetría.
2. Calcular la eficiencia de la columna.

CAPITULO II. GENERALIDADES 37

CRITERIOS

1. Factor de capacidad (k'): $1 < k' < 10$
2. Factor de selectividad (alfa): $1 < \text{alfa} < 2$
3. Factor de simetría (F): $0.80 < F < 1.2$
4. Factor de resolución (R): $1.5 < R < 5$

CAP. III PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

1. Reactivos.

Paracetamol sustancia de referencia.

Naproxén sódico sustancia de referencia.

Metanol CLAR, Baxter.

Acetonitrilo CLAR, Baxter.

Fosfato monobásico de potasio, J.T. Baker.

Hidróxido de potasio, J.T. Baker.

Acido fosfórico 10 %.

Hidróxido de sodio, J.T. Baker.

2 Material.

Microjeringa de 100 ml, Marca: Hamilton.

Equipo de filtración, Marca: Millipore

3. Equipo.

Memotitulador, Marca: Mettler, Modelo: DL25 equipado con:

- Un electrodo de cloruro de potasio

Baño de ultrasonido, Marca: Ultrasonik, Modelo: 300

Agitador magnético con 6 plazas, Marca: Lab-line

Cromatógrafo de líquidos, Marca: Beckman, equipado con:

-Bomba programable para solventes, Modelo: 126

- Detector programable con arreglo de diodos, Modelo: 168
- Columna C₁₈ Resolve de 15 cm, Marca: Millipore
- Columna C₁₈ μ Bondapak de 15 cm, Marca: Millipore
- Computadora personal, Marca: Compaq, Modelo: Prolinea 4/33

3.2. SELECCION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Ambos activos han sido estudiados ampliamente por lo que en la literatura existen diversos métodos para su cuantificación individual. Estos incluyen métodos espectrofotométricos, potenciométricos y métodos por CLAR entre otros.

Para el estudio de estabilidad del paracetamol y naproxén en suspensión, se requirió un método analítico capaz de cuantificar en forma selectiva estos fármacos en presencia de sus productos de degradación, excipientes e impurezas, y así obtener datos confiables y reproducibles.

Para lograr este fin se desarrolló un método analítico por CLAR por ser una de las técnicas analíticas más poderosas disponibles para la resolución de mezclas complejas de forma eficiente. La técnica elegida fué por cromatografía en fase reversa ya que, dadas las características fisicoquímicas de los activos, es la modalidad que ofrece mayor selectividad en la separación.

3.3. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.

En el desarrollo del método analítico, se consideraron las propiedades fisicoquímicas de los fármacos. pKa y solubilidad principalmente, además de revisar los métodos cromatográficos reportados en la literatura (USP XXII, B.P. XII, A.O.A.C. y bibliografía 8,12,14,18,29). La mayor parte de los métodos publicados describen procedimientos cromatográficos para la determinación individual de estos fármacos. Poca es la bibliografía encontrada en la cual se

CAP.III. PARTE EXPERIMENTAL 40

cuantifiquen ambos activos en una misma corrida. El método efectuado por F. Nielsen-Kudsk (18) es uno de ellos.

Nielsen-Kudsk describió el siguiente procedimiento para la determinación de 16 fármacos antiinflamatorios y analgésicos en plasma humano, entre los que se encuentran el naproxén y el paracetamol:

Fase móvil : Metanol:Buffer fosfatos,(55:45)

Columna : μ Bondapak C₁₈ Waters de 3.9 mm de diámetro interno x 30 cm de longitud.

Veloc. de flujo : 2.0 ml/min

Long. de onda : 254 nm

Sobre esta base, el autor empleó variaciones de la fase móvil para obtener la resolución óptima de algunos fármacos. En el caso del paracetamol, disminuyó la concentración de metanol en un 35%, para lograr mayor retención del activo en la fase estacionaria y determinarlo específicamente con respecto al plasma.

En el caso del naproxén, describe el empleo de una fase móvil alternativa, con la cual logra disminuir el tiempo de retención del activo y de ésta forma cuantificarlo fácilmente. La fase móvil empleada es la siguiente: 40% acetonitrilo en acetato de amonio 100 mM, pH 5.5 ajustado con ácido acético.

Para el desarrollo del método cromatográfico, se utilizó como referencia el artículo citado anteriormente, empleando inicialmente las condiciones establecidas para la cuantificación del paracetamol (fase móvil 1). Sin embargo, en los estudios preliminares de la especificidad, se vió que el método no era capaz de separar los ingredientes del placebo del paracetamol y además, el tiempo de retención del naproxén fué de 24 min, por lo cual se efectuaron modificaciones posteriores con la finalidad de optimizar el método y tratar de obtener la resolución adecuada entre los activos, excipientes y los productos de degradación. Esto se logró modificando los siguientes parámetros:

CAP.III. PARTE EXPERIMENTAL 41

- 1) pH.
- 2) Velocidad de flujo.
- 3) Composición de la fase móvil y
- 4) Empaque de la columna.

A continuación se encuadran las condiciones cromatográficas probadas empleadas en el desarrollo del método analítico. (cuadro No 4)

Las concentraciones de paracetamol y naproxén empleadas fueron 16 y 20 mcg/ml de la fase móvil 1 a la fase móvil 10; a partir de la fase móvil 11, las concentraciones son 8 y 10 mcg/ml respectivamente.

La especificidad con respecto a placebo, se probó en todo el desarrollo del método, ya que éste contiene varios compuestos que absorben a la longitud de onda de trabajo e interfieren con la cuantificación del paracetamol.

La especificidad de muestras degradadas de materia prima, placebo y formulación completa en condiciones ácidas, básicas y de oxidación, se probó solamente con las fases móviles 11 y 12.

DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.

Fase móvil	Composición	pH	Vel. de flujo (ml/min)	Columna	tr paracetamol	tr naproxen.
1	600 Buffer fosfatos 400 metanol	4.0	2.0	C ₁₈ Nova Pak	0.71	24.0
2	600 Buffer fosfatos 400 metanol	7.0	2.0	C ₁₈ Nova Pak	0.72	6.5
3	600 Buffer fosfatos 400 metanol	7.0	1.0	C ₁₈ Nova Pak	1.24	11.25
4	600 Buffer fosfatos 400 acetonitrilo	4.0	1.0	C ₁₈ Nova Pak	1.04	4.6
5	600 Buffer fosfatos 400 acetonitrilo	7.0	1.0	C ₁₈ Nova Pak	1.04	1.54
6	800 Buffer fosfatos 200 acetonitrilo	7.0	0.8	C ₁₈ Nova Pak	1.64	6.0
7	900 Buffer fosfatos 100 acetonitrilo	7.0	0.8	C ₁₈ Nova Pak	2.46	> 25.0
8	800 Buffer fosfatos 110 metanol 90 acetonitrilo	7.0	0.8	C ₁₈ Nova Pak	2.10	aprox. 25.0
9	800 Buffer fosfatos 110 metanol 90 acetonitrilo	7.0	2.0	C ₁₈ Nova Pak	0.87	9.6
10	800 Buffer fosfatos 110 metanol 90 acetonitrilo	7.0	0.8 y 2.0	C ₁₈ Nova Pak	2.1	12.6
11	800 Buffer fosfatos 100 metanol 100 acetonitrilo	7.0	0.5 y 2.0	C ₁₈ Nova Pak	2.0	10.5
12	800 Buffer fosfatos 100 metanol 100 acetonitrilo	7.0	0.5 y 2.0	C ₁₈ Resolve	4.24	15.2

Cuadro 4. Condiciones cromatográficas empleadas en el desarrollo del método analítico.
La F.M. 12, es la fase móvil definitiva.

3.3.1. CONDICIONES DEL METODO CROMATOGRAFICO.

Las condiciones cromatográficas seleccionadas con las cuales se logró obtener la cuantificación específica de los componentes, son las siguientes:

Fase móvil: Buffer de fosfatos 0.1 M 800 ml
Metanol 100 ml
Acetonitrilo 100 ml

Columna : Reólve C₁₈ de 3.9 mm x 150 mm empacada con esferas de 5 μ de diámetro.

Detector : Detector de arreglo de fotodiodos

λ = 230 nm.

Veloc. de flujo : Programada bajo las siguientes condiciones:

tiempo (min)	velocidad de flujo (ml/min)
0	0.5
6.5	2.0
17.5	0.5
21.5	0.5

Más adelante se indicará el proceso de selección de las condiciones cromatográficas, así como el desarrollo y validación del método propuesto.

3.4. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

Después de optimizar el método propuesto se demostró la confiabilidad del mismo, efectuando lo siguiente:

ESPECIFICIDAD.

Se determinó la interferencia debida a placebo y fase móvil, evaluando muestras de fase móvil y placebo aplicando el método propuesto (punto 3.2)

ESPECIFICIDAD PARA ESTABILIDAD.

Para evaluar la especificidad del método por CLAR, se sometieron a degradación acelerada muestras de los fármacos como materia prima, placebo y la formulación completa para obtener productos de degradación y establecer si estos interfieren o no en la detección de ambos activos.

Para ello, se prepararon soluciones a pH= 12 a 14, pH= 1 a 2 y también otras adicionadas con peróxido de hidrógeno, y se sometieron dichas muestras a temperatura de 80° C (tabla 1).

MUESTRA	CONDICIONES DE DEGRADACION	TIEMPO DE EXPOSICION
Formulación	Acido (80° C)	Aprox 6 h
	Base (80° C)	Aprox 6 h
	Oxidación (80°C)	Aprox 3 h
Materia prima (Paracetamol y naproxén)	Acido (80° C)	Aprox 6 h
	Base (80° C)	Aprox. 6 h
	Oxidación (80°C)	Aprox. 3 h
Placebo	Acido (80° C)	Aprox 4 h
	Base (80° C)	Aprox 4 h
	Oxidación (80°C)	Aprox 3 h

Tabla 1 . Condiciones de degradación de las muestras de paracetamol, naproxén, placebo y formulación en solución acuosa.

LINEARIDAD.

a) Linearidad del Sistema.

Se determinó haciendo diluciones de una misma solución patrón conteniendo paracetamol y naproxén, a tener concentraciones equivalentes al 50, 75, 100, 125 y 150 % de lo establecido en el método analítico y analizándolas por triplicado.

b) Linearidad del Método.

Se determinó analizando placebos adicionados con los principios activos (paracetamol y naproxén) a los niveles de 80, 100 y 120 % de la cantidad seleccionada, efectuando los análisis por triplicado de cada concentración.

PRECISION.

a) Precisión del Sistema.

Se determinó analizando una misma muestra de solución estándar de paracetamol y naproxén, correspondiente al 100% de lo establecido en la linealidad del sistema, por sextuplicado.

b) Precisión del Método.

La reproducibilidad se determinó con los resultados de análisis de un lote piloto de polvo para reconstituir, realizados por dos analistas en dos días diferentes, con tres replicaciones por día.

REPETIBILIDAD Y EXACTITUD.

Se demostró analizando placebos adicionados de los principios activos al 100 % de la cantidad seleccionada por sextuplicado, de manera independiente, aplicando la metodología propuesta.

TOLERANCIA DEL SISTEMA.

Se llevó a cabo comparando los parámetros cromatográficos (α k.Rs), de una misma muestra, utilizando la fase móvil seleccionada, con las modificaciones que se muestran en la siguiente tabla:

pH	metanol	acetonitrilo
6.5	+ 10 %	+ 10 %
7.5	- 10 %	- 10 %

También se consideraron los resultados obtenidos con la fase móvil 11, en la que se empleó una columna Nova Pack C₁₈.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se determinó mediante el análisis, por triplicado, de una muestra analizada recién preparada y después de transcurridas 6 h y 24 h, almacenadas a temperatura ambiente y en condiciones de obscuridad.

CAP. IV. RESULTADOS Y DISCUSION .

4.1. Selección de las condiciones cromatográficas.

4.1.1. Selección de la fase móvil.

1) Efecto del pH.

Al cambiar el pH de la fase móvil 1, de 4.0 a 7.0 (fase móvil 2) se observó una disminución en el tiempo retención del naproxén debido a que a estas condiciones se logra ionizar un 99.8 % al naproxén y, al tenerlo en su forma iónica, se hace más afin a la fase móvil disminuyendo su retención, por lo que este pH se mantuvo en todo el desarrollo del método

2) Composición de la fase móvil.

Como se muestra en la fig. 4 cromatograma 2, al emplear acetonitrilo en vez de metanol como solvente orgánico en la fase móvil, se observa una drástica disminución en el tiempo de retención del naproxén. Lo que demuestra que el acetonitrilo presenta mayor selectividad por el naproxén que el metanol (fase móvil 3 y fase móvil 5).

Considerando el efecto que ejerce el pH y el solvente orgánico seleccionado en el tiempo de retención del naproxén, se propuso la fase móvil 6, que contiene buffer de fosfatos pH = 7 y acetonitrilo como solvente orgánico en una proporción de 800/200 (respectivamente), con el fin de eluir fácilmente al naproxén, y controlar la elución del paracetamol. Esta fase móvil, fue considerada como óptima para la separación de los activos, así como la más adecuada para lograr un tiempo de elución total razonable. No obstante lo anterior, con esta fase móvil no se logró analizar específicamente el paracetamol con respecto al placebo

CAP. IV. RESULTADOS Y DISCUSION 48

Con el fin de mejorar la resolución, se decidió disminuir aun más la concentración de acetonitrilo (100 ml) en la fase móvil (fase móvil 7). Al disminuir la concentración de acetonitrilo a la mitad en la fase móvil, el paracetamol se determinó específicamente con respecto al placebo, sin embargo el tiempo de retención del naproxén fué mayor a los 25 min. De este modo, considerando las diferencias de polaridad de ambos compuestos, se decidió emplear una fase móvil ternaria (fase móvil 8) para lograr la selectividad adecuada y obtener un control en el tiempo de elución de los compuestos.

La fase móvil 8, que es una modificación de la fase móvil 6, con la cual se obtuvieron buenos tiempos de retención para ambos compuestos, conserva las mismas proporciones de fase orgánica y acuosa, pero se emplea una mezcla de metanol-acetonitrilo como fase orgánica.

3) Velocidad de flujo.

Empleando la fase móvil ternaria (fase móvil 8), con una velocidad de flujo de 0.8 ml/min se determina de forma específica el paracetamol, pero el tiempo de retención del naproxén es elevado.

En cambio, al emplear una velocidad de flujo de 2.0 ml/min (fase móvil 9) la especificidad del paracetamol se pierde, más sin embargo la elución del naproxén es adecuada.

Por lo anterior, la velocidad de flujo fué programada a lo largo de la corrida, iniciando con una velocidad de flujo de 0.8 ml/min, para obtener la especificidad requerida del paracetamol con respecto al placebo, y posteriormente incrementada a 2.0 ml/min con el fin de disminuir el tiempo de retención del naproxén y acortar el tiempo de análisis (fase móvil 10).

Con el fin de incrementar al máximo la resolución entre el paracetamol y el placebo, se disminuyó a 0.5 ml/min la velocidad de flujo inicial en la corrida. En cuanto a la concentración de solvente orgánico, se ajustó nuevamente para lograr cantidades equivalentes de metanol y

acetonitrilo (100 ml c/u) ya que estas cantidades se miden con mayor facilidad y evitar error en la preparación de la fase móvil (fase móvil 11).

Aún después de haber realizado las modificaciones indicadas, la resolución lograda entre el paracetamol y los componentes del placebo es de 0.9.

4) Empaque de la columna.

Con el fin de optimizar la resolución, se aumentó el número de platos teóricos empleando una columna cromatográfica Resolve C₁₈ con un tamaño de partícula de 5µm, con lo que se obtuvo la resolución deseada entre el paracetamol y el placebo (fase móvil 12)

Con ello, el tiempo de retención del naproxén aumentó a 16-17 min, pero aún así se consideró adecuado como tiempo de análisis, dado que con ello se obtuvo el método óptimo para la cuantificación específica del paracetamol y naproxén en suspensión, por lo que la fase móvil se aceptó como fase móvil definitiva.

Con ésta fase móvil se analizaron los cromatogramas corridos de muestras degradadas y se comprobó la especificidad de la misma, comparando con una solución estándar de referencia de paracetamol y naproxén.

Las fases móviles referidas anteriormente se presentan en el cuadro 4.

5) Método de cuantificación

Después de que se ha seleccionado el sistema cromatográfico, y que ha demostrado su especificidad, se procede a cuantificar los picos de la muestra mediante estandarización externa.

El método de cuantificación empleando un estándar externo, en vez de un estándar interno, fué preferido por diversas razones.

El compuesto elegido como estándar interno, debe eluir cerca de los solutos que serán cuantificados. En este caso, debe eluir en un tiempo de retención entre ambos compuestos, es decir, después del pico de paracetamol y antes del pico del naproxén.

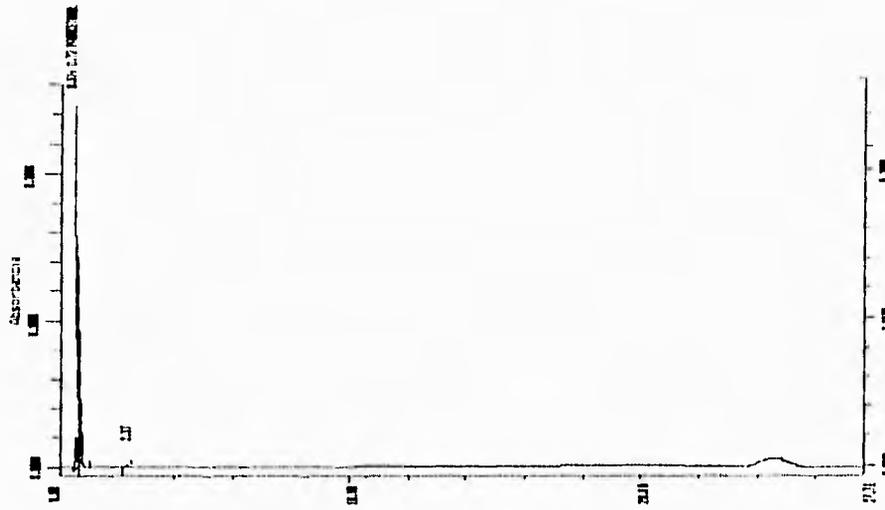
El método cromatográfico seleccionado, no permite la elución de un estándar interno en este rango de tiempo por las siguientes razones:

Existe elución de algunos productos de degradación del naproxén después del tiempo de retención del paracetamol.

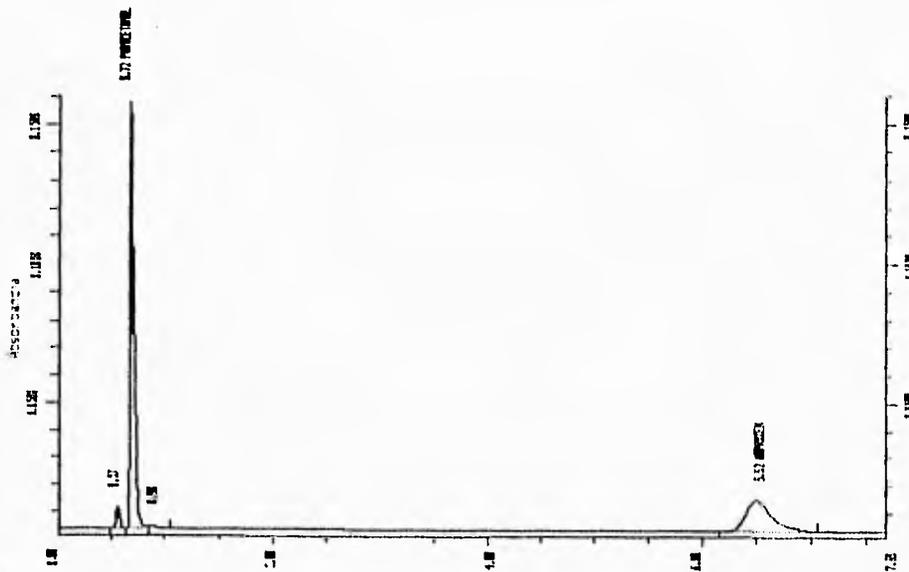
Además, el sistema cromatográfico presenta un cambio en la velocidad de flujo, provocando una inclinación en la línea base que impide la cuantificación adecuada del compuesto en este rango de tiempo.

Por último, la validación del método analítico demuestra que no es necesario el empleo de un estándar interno para una adecuada cuantificación de los activos.

A continuación se muestran algunos cromatogramas representativos del desarrollo del método analítico.



Cromatograma 1.: fase móvil 1.



Cromatograma 2.: fase móvil 2.

FIG.4. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.

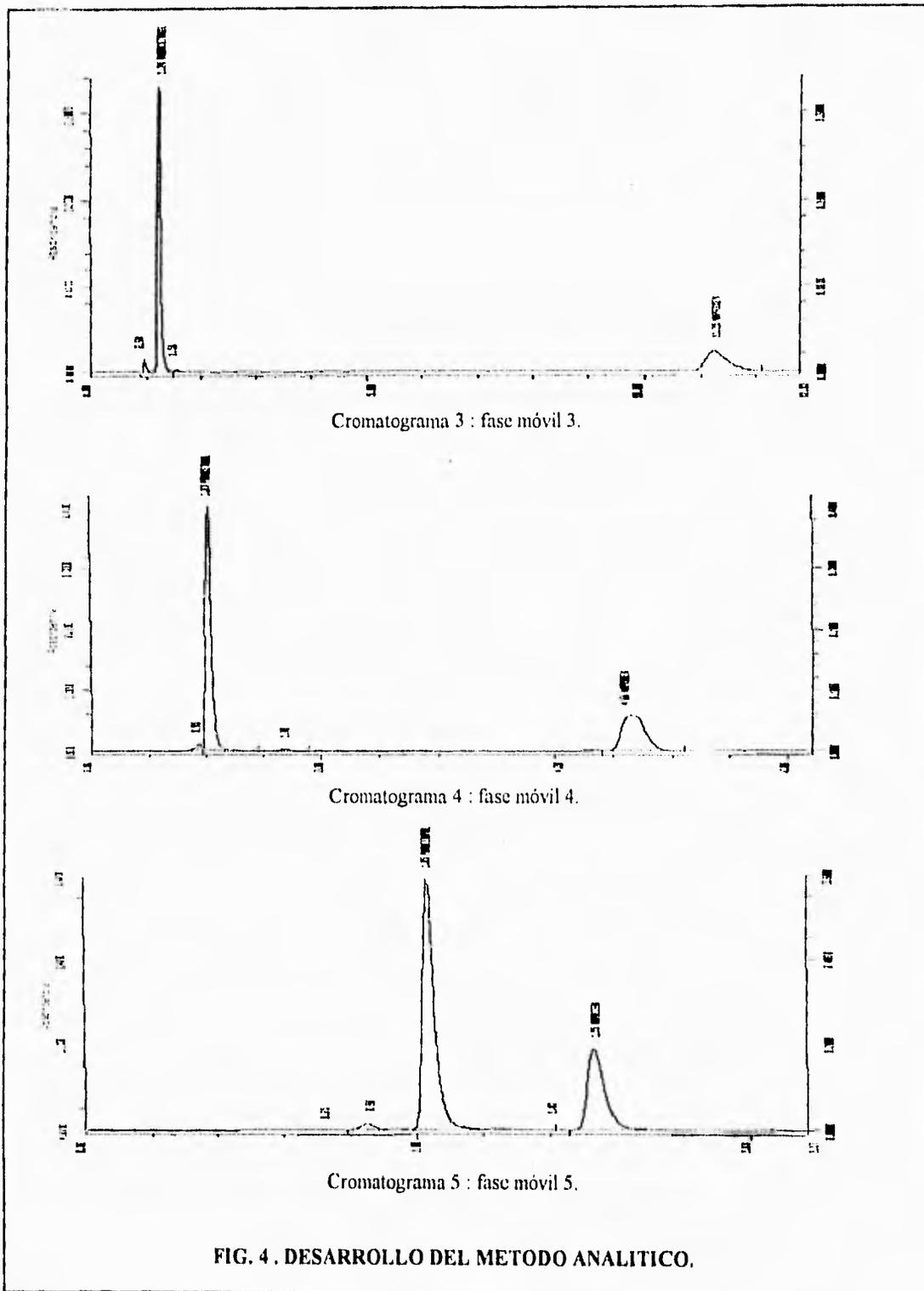
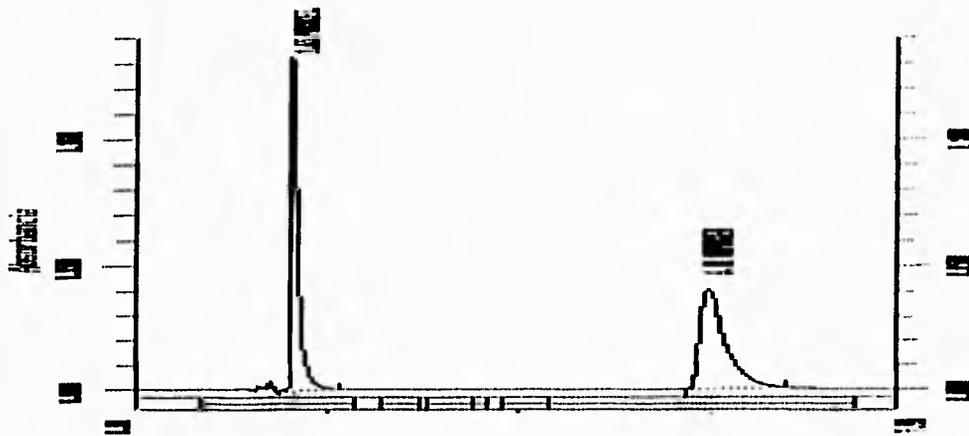
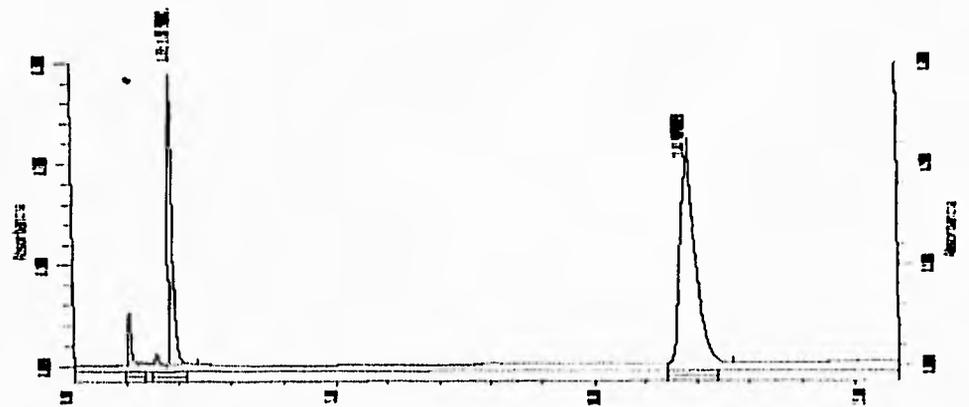


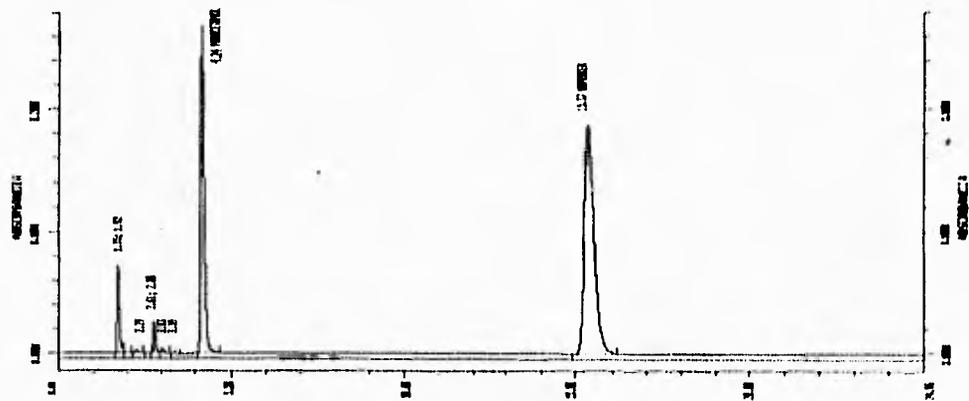
FIG. 4. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.



Cromatograma 6 : fase móvil 7.



Cromatograma 7 : fase móvil 11.



Cromatograma 8 : fase móvil 12.

FIG. 4. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.

4.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

4.2.1. ESPECIFICIDAD.

Se evaluaron muestras de fase móvil sin observarse picos a los tiempos de retención correspondientes a los del paracetamol y naproxén sustancias de referencia (Fig.5.cromatograma 1)

Se evaluaron muestras de placebo sin observarse picos a los tiempos de retención correspondientes a los del paracetamol y naproxén sustancias de referencia (Fig.5. cromatograma 2)

ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD.

Se evaluaron muestras de placebo sometidas a degradación ácida, básica y de oxidación, sin observarse elución de picos al tiempo de retención del paracetamol y naproxén sustancias de referencia. La causa de degradación más notable fué la de placebo sometido a oxidación. (Fig.5. cromatogramas: 4 a 6)

Se evaluaron muestras de paracetamol y naproxén sometidas aisladamente a degradación ácida, básica y de oxidación.

El paracetamol degradado como materia prima en condiciones ácidas presenta 3 picos con tiempos de retención aproximados de 2.82, 3.20 y 3.72 min, los que se presentan bien resueltos con respecto al paracetamol y naproxén sustancias de referencia.

En condiciones básicas la degradación del paracetamol muestra 2 señales con un tiempo de retención aproximado a 1.81 y 2.22 min.

En condiciones de oxidación, el paracetamol presenta una señal a un tiempo de retención aproximado a 2.35 min.

En ambos casos, los picos de degradación se encuentran bien resueltos con respecto a los activos (Fig.5. cromatogramas 7 a 9).

El naproxén degradado como materia prima en condiciones ácidas, muestra un pico a un tiempo de retención aproximado de 6.99 min, el cual no interfiere con respecto al tiempo de elución del paracetamol y naproxén sustancias de referencia (cromatograma 10).

El naproxén en condiciones básicas es muy estable, aun bajo condiciones extremas ya que después de haber sido sometido a 80°C en solución de NaOH 0.1 (pH aprox 14) durante 8 h, se obtuvo un recobro prácticamente completo (cromatograma 11).

En condiciones de oxidación, el naproxén presenta un pico a un tiempo de retención aproximado de 2.13 min (cromatograma 12).

En ambos casos (condiciones ácidas y de oxidación), los picos de degradación se encuentran bien resueltos con respecto a los activos

Se evaluaron muestras de placebo cargado sometidas a degradación ácida y de oxidación, sin observarse elución de picos al tiempo de elución del paracetamol y naproxén sustancias de referencia. (Fig.5. cromatogramas 13 y 15).

En condiciones básicas, la formulación fue difícil de degradar y no se observó ninguna interferencia con respecto al tiempo de elución del paracetamol y naproxén sustancias de referencia (cromatograma 14).

Como puede observarse en los 3 casos, los componentes del placebo son más susceptibles a degradación que los activos, presentando un efecto protector para éstos

CONDICIONES NORMALES	t_R PARACETAMOL = 4.6 min		t_R NAPROXEN = 17.0 min
CONDICIONES DE DEGRADACION	TIEMPO DE RETENCION APROXIMADO DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION (min)		
DEGRADACION	ACIDA	BASICA	OXIDACION
PARACETAMOL	3.2, 3.72	1.86, 2.22	2.35
NAPROXEN	6.99	-----	2.13
FORMULACION*	1.96, 3.16, 3.40	2.03, 3.25	2.20, 2.35

Tabla 3 .Tiempos de retención de los productos de degradación
* t_r de los picos principales del placebo: 1.75, 2.80, 3.03

4.2.1.1. Discusión de Resultados.

Analizando los resultados obtenidos, podemos observar que al degradar los estándares de paracetamol y naproxén, no hay interferencias en la detección de ambos compuestos. En el caso del naproxén degradado por base, no se observan productos de degradación, sin embargo, hay que tomar varias consideraciones:

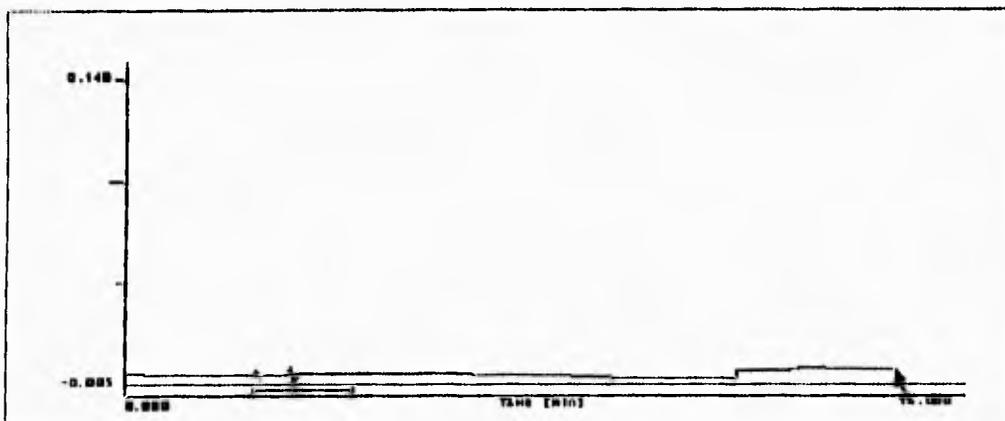
- a) Las condiciones de degradación a las que fueron sometidos tanto los activos como la formulación y el placebo fueron exageradamente severas (ácido, base, oxidación) para lograr obtener productos de degradación que permitieran analizar la especificidad del método y difícilmente podrán llegar a alcanzarse en los estudios de estabilidad de la formulación.
- b) Las condiciones de degradación de mayor importancia son las de acidez y las de oxidación, ya que la formulación al encontrarse en su forma reconstituida, presenta un pH ácido.
- c) Adicionalmente, como se había mencionado con anterioridad, los componentes del placebo son más susceptibles a degradarse que los activos, presentando un efecto protector para

CAP. IV. RESULTADOS Y DISCUSION 57

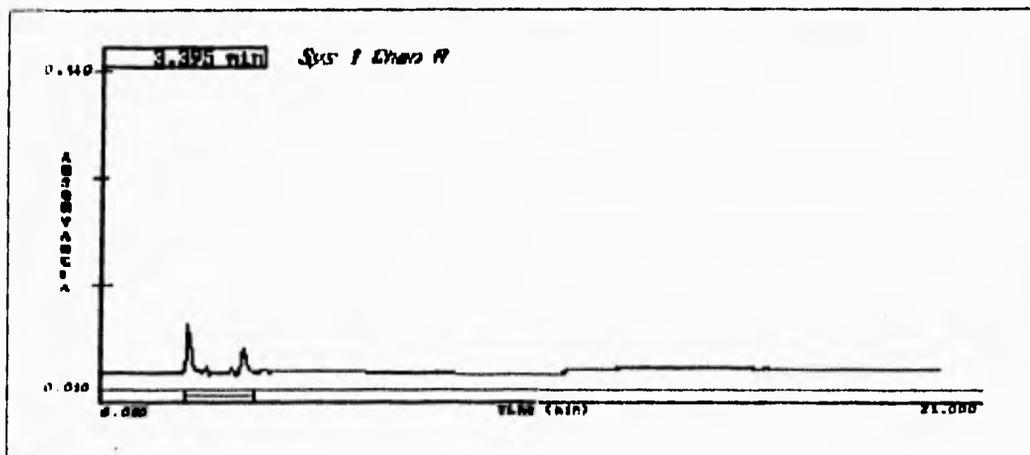
éstos y tomando en cuenta que sus productos de degradación no interfieren en la determinación de los activos.

Por lo tanto, se puede considerar que el método desarrollado por CI.AR. muestra ser capaz de separar, identificar y cuantificar el paracetamol y el naproxén sin que los excipientes y productos de degradación de ambos activos interfieran en el análisis.

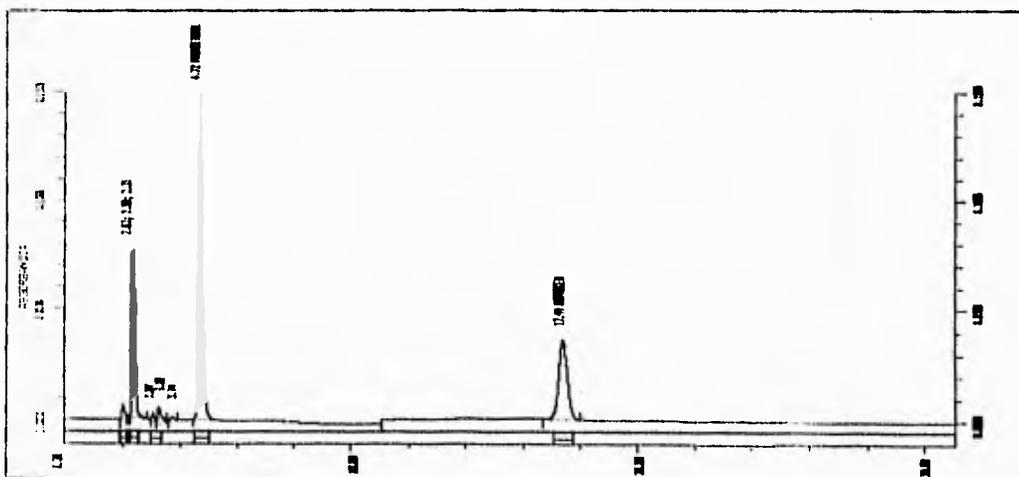
En la fig. 5 se muestran los cromatogramas referentes a la especificidad del método analítico



Cromatograma 1.: fase móvil.

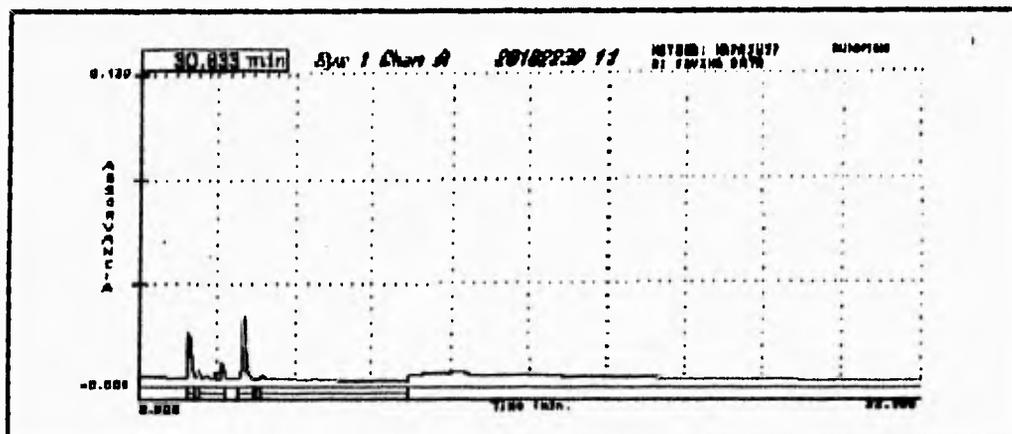


Cromatograma 2.: placebo.

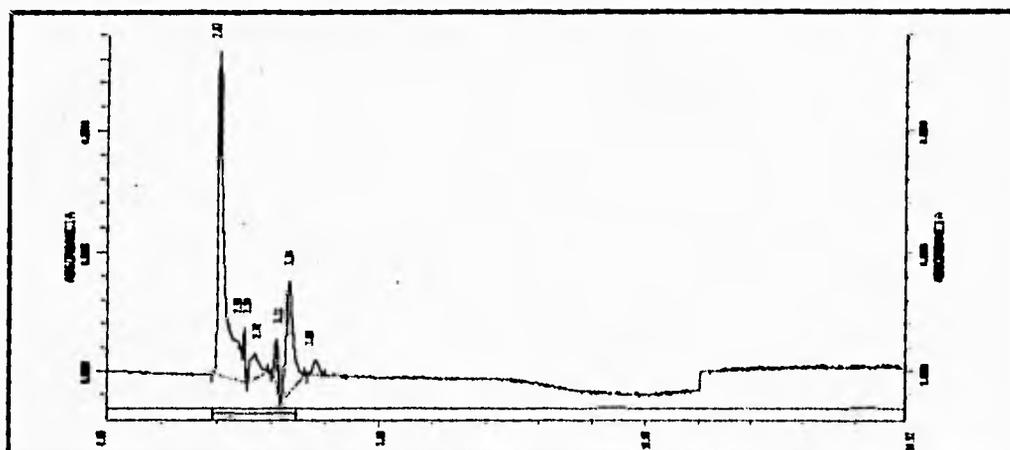


Cromatograma 3. : F.M de referencia: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (800:100:100).

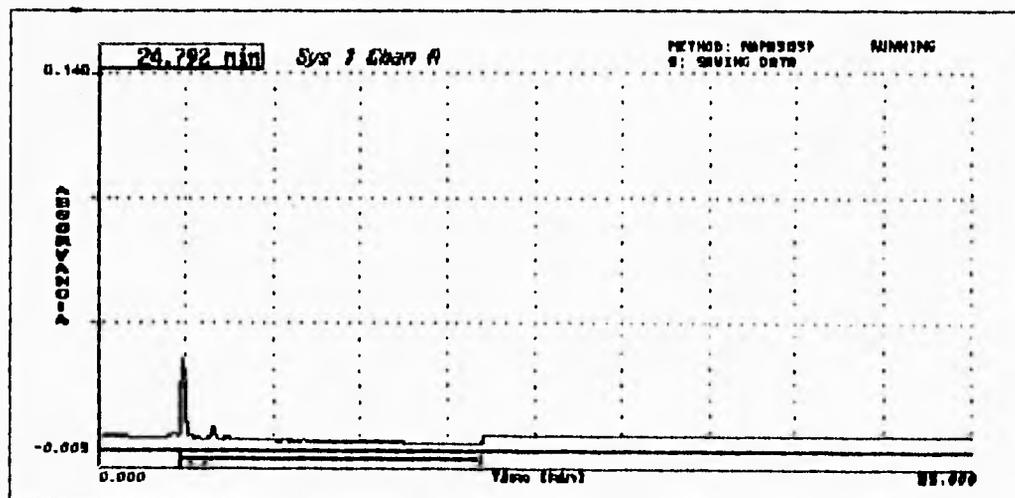
FIGURA 5. ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO.



Cromatograma 4.: placebo degradado con ácido.

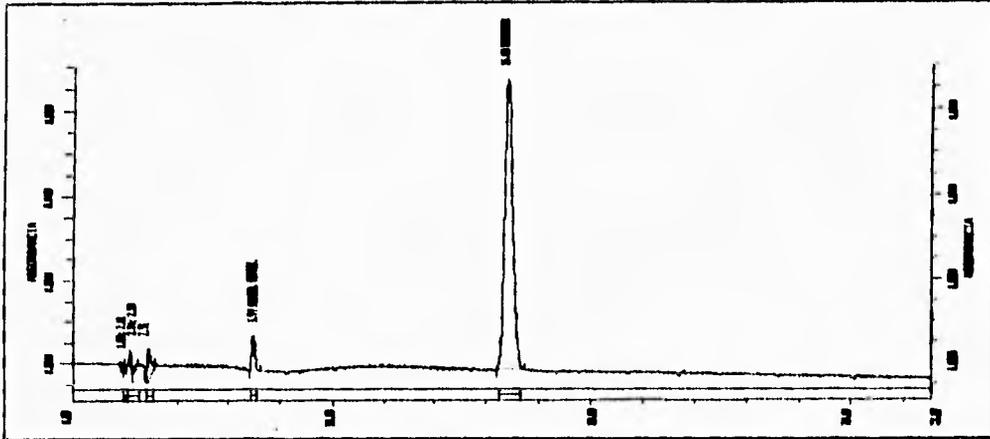


Cromatograma 5.: placebo degradado con base.

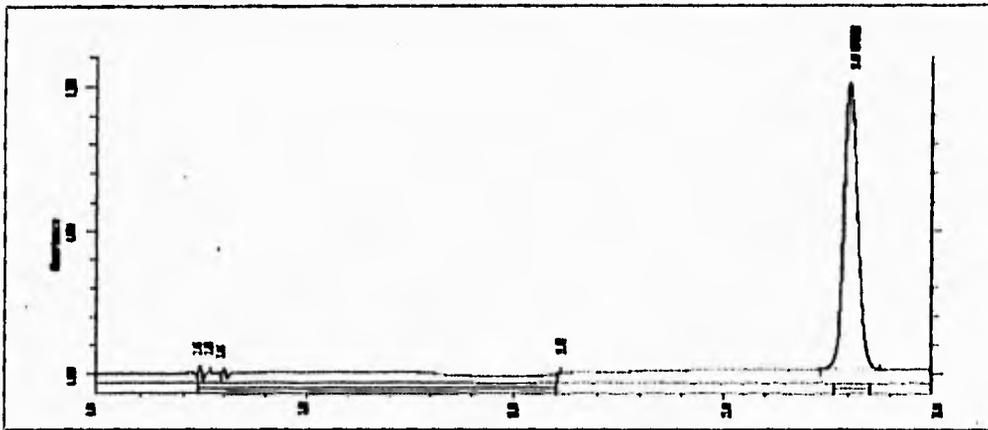


Cromatograma 6 : placebo degradado por oxidación.

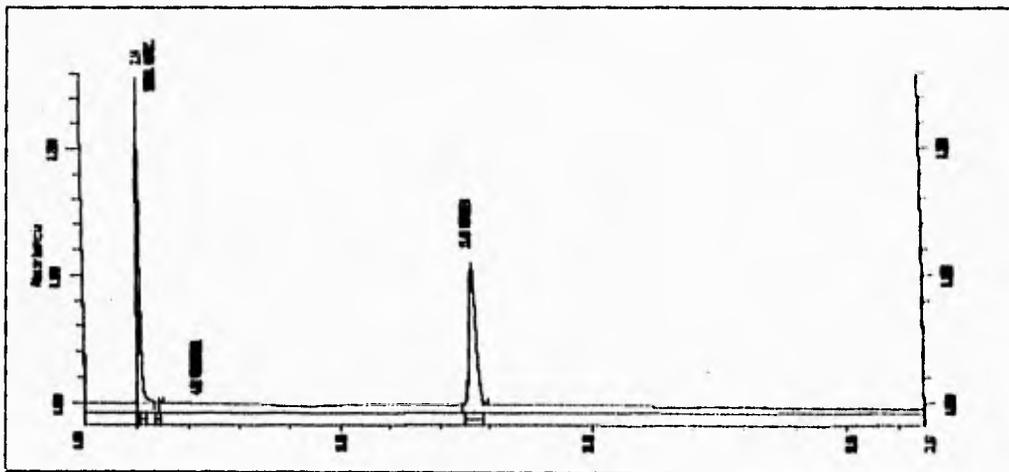
FIGURA 5. ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO.



Cromatograma 10 : naproxén degradado con ácido.

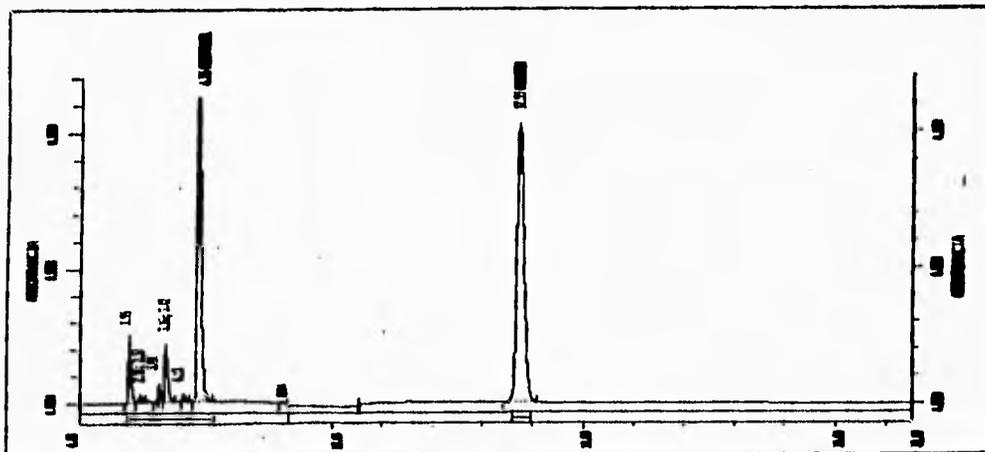


Cromatograma 11 : naproxén degradado por base.

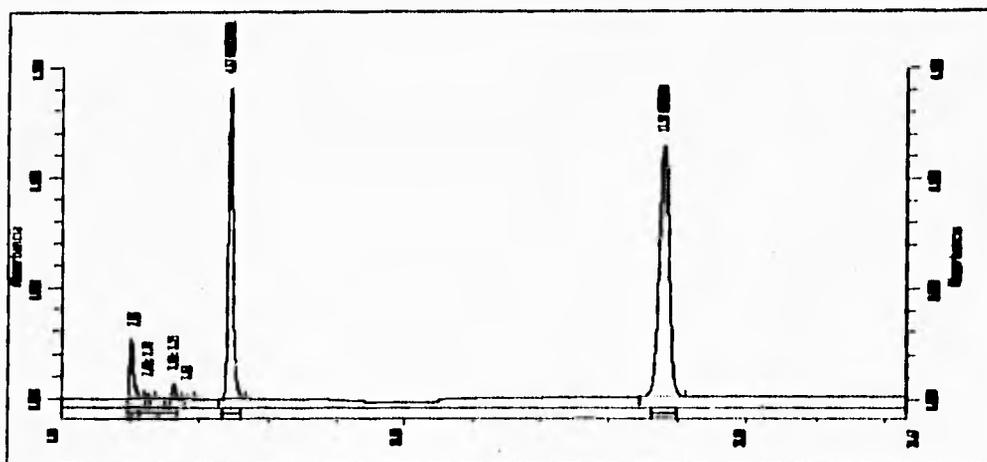


Cromatograma 12 : naproxén degradado por oxidación.

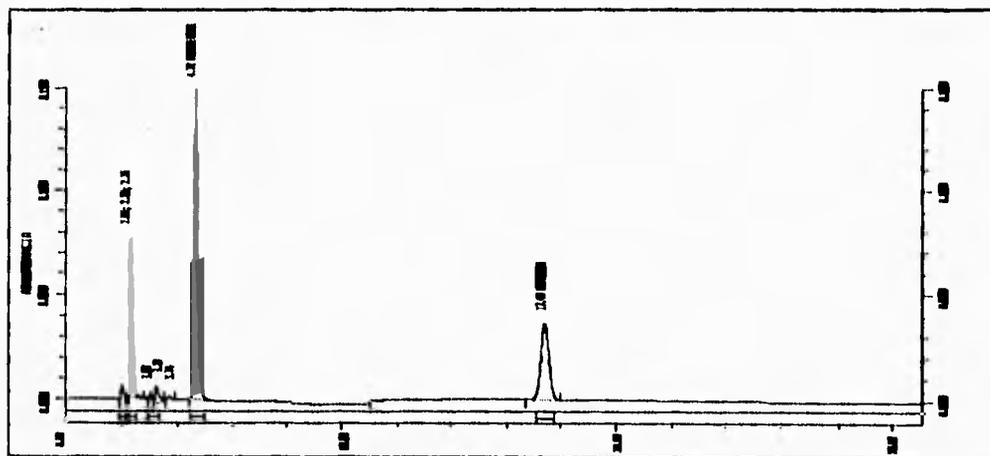
FIGURA 5. ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO.



Cromatograma 13 : formulación degradada con ácido.



Cromatograma 14 : formulación degradada con base.



Cromatograma 15 : formulación degradada por oxidación.

FIGURA 5. ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO

4.2.2. LINEARIDAD.**a) LINEARIDAD DEL SISTEMA****RESULTADOS****PARACETAMOL**

nivel %	CONCENTRACION mcg/ml	AREA DEL PICO	FACTOR AREA / CONC.	C.V. (%) FACTOR
50	4.00	9.4324	2.3581	1.6633
50	4.00	9.5951	2.3988	
50	4.00	9.2813	2.3203	
75	6.00	13.8023	2.3004	0.4946
75	6.00	13.9260	2.3210	
75	6.00	13.9158	2.3193	
100	8.00	18.4824	2.3103	0.4050
100	8.00	18.6327	2.3291	
100	8.00	18.5597	2.3200	
125	10.00	23.0891	2.3089	0.1207
125	10.00	23.1278	2.3128	
125	10.00	23.0737	2.3074	
150	12.00	27.5868	2.2989	0.4543
150	12.00	27.7011	2.3084	
150	12.00	27.8382	2.3199	

ANALISIS DE RESULTADOS

X FACTOR	=	2.3221
C.V FACTOR	=	1.0955%
r ²	=	0.9998
r	=	0.9999
m	=	2.2880
b	=	0.2321

CRITERIO DE ACEPTACION

Ya que $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y C.V. $< 1.5\%$, se cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

4.2.2. LINEARIDAD**a) LINEARIDAD DEL SISTEMA.****RESULTADOS.****NAPROXEN**

nivel %	CONCENTRACION mcg/ml	AREA DEL PICO	FACTOR AREA /CONC.	C V (%) FACTOR
50	5.00	17.5466	3.5093	1.1610
50	5.00	17.6582	3.5316	
50	5.00	17.9453	3.5891	
75	7.50	26.7311	3.5641	0.5642
75	7.50	26.4363	3.5248	
75	7.50	26.6325	3.5510	
100	10.00	35.6018	3.5602	0.3560
100	10.00	35.3545	3.5355	
100	10.00	35.4339	3.5434	
125	12.50	44.4706	3.5576	0.4557
125	12.50	44.0690	3.5255	
125	12.50	44.2369	3.5390	
150	15.00	53.4174	3.5612	0.4516
150	15.00	52.9371	3.5291	
150	15.00	53.1731	3.5449	

ANALISIS DE RESULTADOS

\bar{X} FACTOR	=	3.5444
C.V FACTOR	=	0.5647%
r	=	0.9999
r^2	=	0.9998
b	=	0.0121
m	=	3.5430

CRITERIOS DE ACEPTACION

Ya que $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y C.V. $< 1.5\%$, se cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

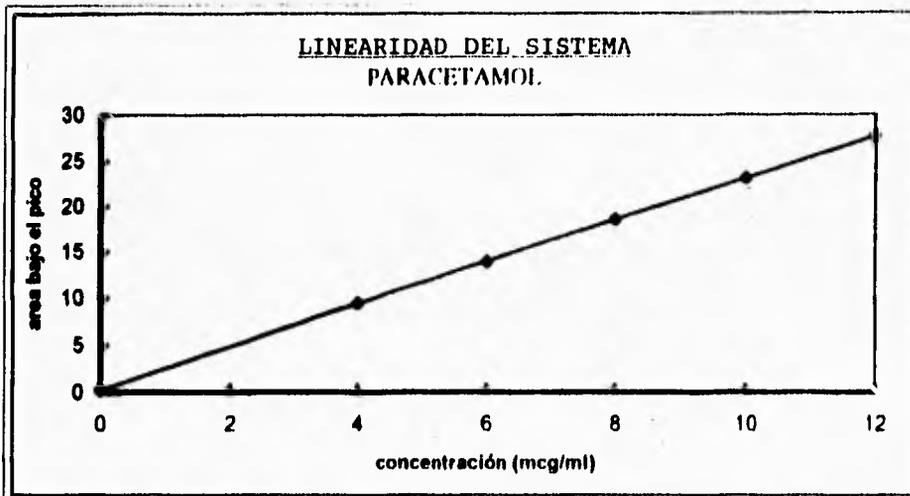


Gráfico No. 1 : Linealidad del sistema (paracetamol).

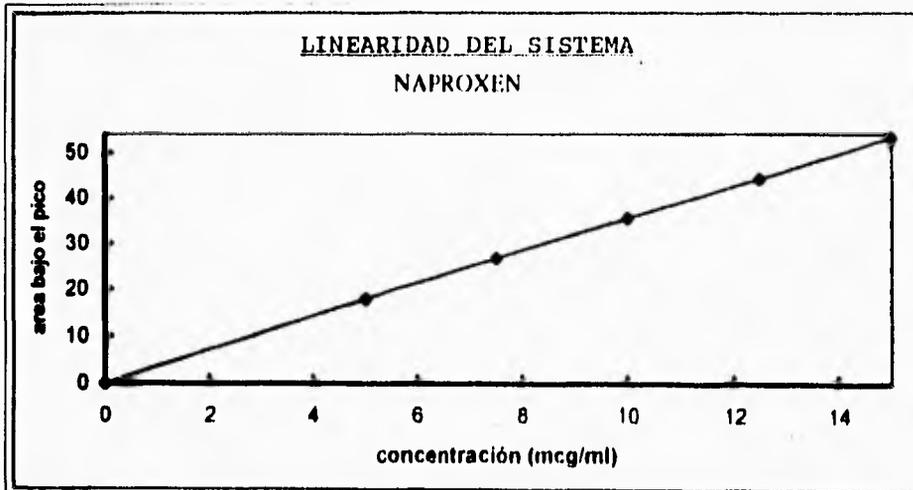


Gráfico No. 1 : Linealidad del sistema (naproxén).

4.2.2. LINEARIDAD**b) LINEARIDAD DEL METODO.****RESULTADOS****PARACETAMOL**

NIVEL %	mcg/ml ADICIONADOS	mcg/ml RECUPERADOS
80	6.4151	6.4287
80	6.3832	6.3957
80	6.4151	6.4540
100	7.9910	7.9319
100	7.9592	7.9763
100	8.0149	8.0449
120	9.6067	9.5776
120	9.6147	9.5873
120	9.5908	9.6992

ANALISIS DE RESULTADOS**TABLA DE ANADEVA**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	15.3161	15.31610	5753.3548	5.5900
ERROR DE REGRESION	7	0.0186	0.00266		
FALTA DE AJUSTE	1	0.00131	0.00131	0.4534	5.9900
ERROR PURO	6	0.01730	0.00289		

F de tablas para Regresión 5.59
 Nivel de probabilidad 0.95 % ($\alpha = 0.05$)
 Grados de Libertad 1, 7.

F de tablas para Falta de Ajuste 5.99
 Nivel de probabilidad 0.95 % ($\alpha = 0.05$)
 Grados de Libertad 1, 6.

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA RECTA DE REGRESION DE LINEARIDAD DEL METODO

Coefficiente de correlación, $r^2 =$ 0.9988
Pendiente, m = 0.9986
 Límites de Confianza, LCB = 0.9906 a 1.0065
t calculada = 0.1006
t tablas = 2.3646 con grados de libertad = 7 y $\alpha = 0.025$

Intercepto = 0.0229
 Límites de confianza, LCB = -0.2294 a 0.2752
t calculada = 0.0123
t tablas = 2.3646 con grados de libertad = 7 y $\alpha = 0.025$

CRITERIO DE ACEPTACION.

Siendo que el valor de F de regresión calculada es mayor que la F de tablas con grados de libertad 1, 7 y $\alpha = 0.95$ y el valor de F de falta de ajuste calculada es menor a la F de tablas con grados de libertad 1,6 y $\alpha = 0.95$, se considera que el método es lineal para describir la relación entre cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y), según el modelo siguiente

$$y = mx + b$$

$$\text{donde } m = 0.9986$$

$$b = 0.0229$$

Pendiente e Intercepto.

Siendo que el valor de "uno" quedó incluido en el intervalo de confianza calculado para la pendiente, y que el valor de "cero" se encuentra dentro del intervalo de confianza calculado para el intercepto, el método se considera lineal y proporcional. El criterio de la prueba de "t" sirve como una comprobación, ya que se tiene que t calculada es menor que la t de tablas, es decir, no existe diferencia significativa de la pendiente con el valor de "uno".

4.2.2. LINEARIDAD**b) LINEARIDAD DEL METODO.
RESULTADOS**

<i>NAPROXEN</i>		
NIVEL %	mcg/ml ADICIONADOS	mcg/ml RECUPERADOS
80	8.0178	7.9816
80	8.0099	8.0465
80	8.0258	8.1306
100	9.9545	9.8697
100	9.9864	9.9107
100	9.9864	10.0904
120	12.0028	11.9235
120	11.9949	11.9887
120	12.0267	12.2032

ANALISIS DE RESULTADOS.

TABLA DE ANADEVIA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	23.8518	23.85180	2297.6151	5.5900
ERROR DE REGRESION	7	0.0727	0.01040		
FALTA DE AJUSTE	1	0.00889	0.00889	0.6538	5.9900
ERROR PURO	6	0.0816	0.01360		

F de tablas para Regresión 5.59
 Nivel de probabilidad 0.95 % ($\alpha = 0.05$)
 Grados de Libertad 1.7.

F de tablas para Falta de Ajuste 5.99
 Nivel de probabilidad 0.95 % ($\alpha = 0.05$)
 Grados de Libertad 1.6

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA RECTA DE REGRESION DE LINEARIDAD DEL METODO

Coefficiente de correlación, r^2 0.9970
Pendiente, m = 0.9992
Límites de Confianza, LCB = 0.9499 a 1.04852
t calculada = 0.0342
t tablas = 2.3646 con grados de libertad = 7 y $\alpha = 0.025$

Intercepto = 0.0231
Límites de confianza, LCB = -0.4764 a 0.5225
t calculada = 0.0631
t tablas = 2.3646 con grados de libertad = n-2 y $\alpha = 0.025$

CRITERIO DE ACEPTACION.

Siendo que el valor de F de regresión calculada es mayor que la F de tablas con grados de libertad 1, 7 y $\alpha = 0.95$ y el valor de F de falta de ajuste calculada es menor a la F de tablas con grados de libertad 1,6 y $\alpha = 0.95$, se considera que el método es lineal para describir la relación entre cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y), según el modelo siguiente

$$y = mx + b$$

$$\text{donde } m = 0.9992$$

$$b = 0.0231$$

Pendiente e Intercepto.

Siendo que el valor de "uno" quedó incluido en el intervalo de confianza calculado para la pendiente, y que el valor de "cero" se encuentra dentro del intervalo de confianza calculado para el intercepto, el método se considera lineal y proporcional. El criterio de la prueba de "t" sirve como una comprobación, ya que se tiene que t calculada es menor que la t de tablas, es decir, no existe diferencia significativa de la pendiente con el valor de "uno"

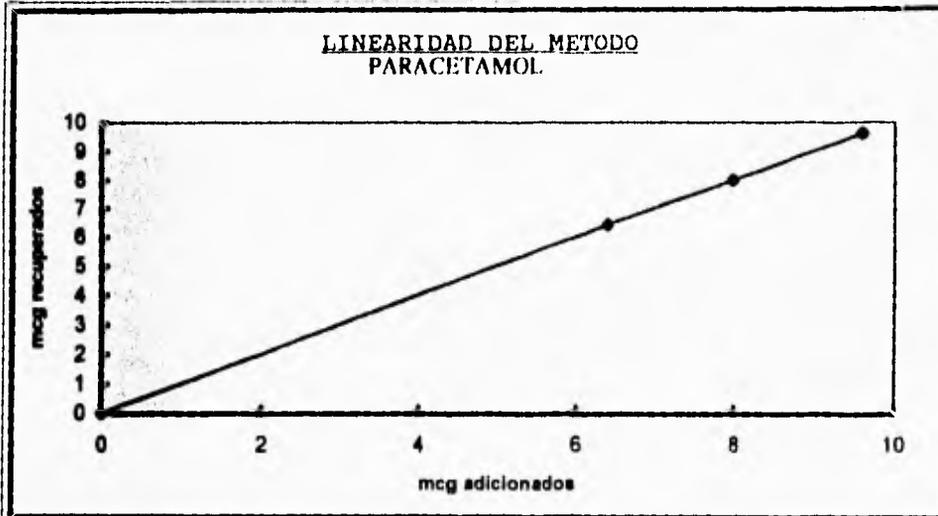


Gráfico No. 2 : linealidad del método (paracetamol).

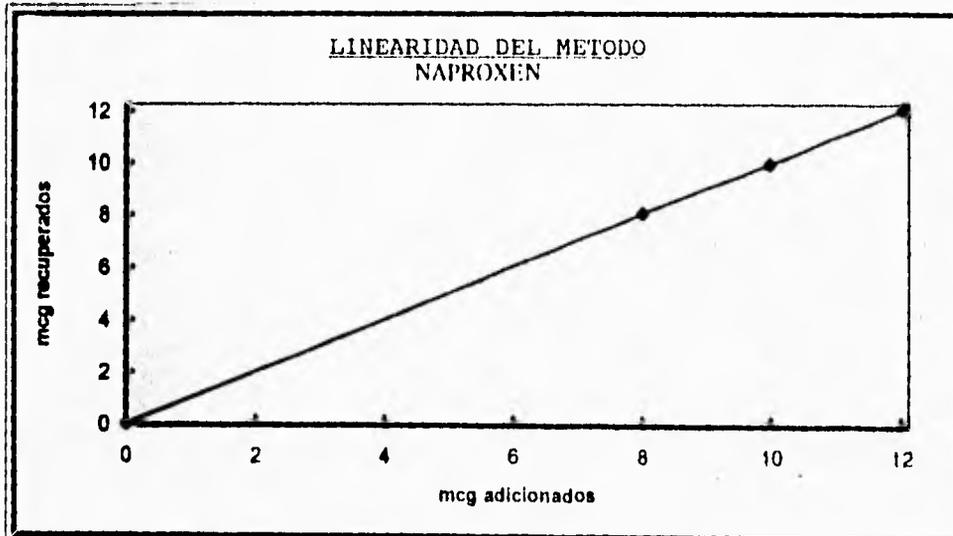


Gráfico No. 2 : linealidad del método (naproxén).

4.2.3. EXACTITUD.**RESULTADOS****PARACETAMOL**

mcg ADICIONADOS	mcg RECUPERADOS	AREA BAJO EL PICO	% RECUPERADO
7.9751	7.9631	19.2591	99.85
7.9830	7.9870	19.3157	100.05
7.9751	7.9328	19.1858	99.47
7.9751	7.9703	19.2759	99.94
7.9910	7.9990	19.3446	100.10
7.9671	8.0316	19.4237	100.81

ANALISIS DE RESULTADOS

\bar{X} 100.0359
 D. E. = 0.4399
 C.V. = 0.4399%
 T TABLAS 2.5706 con 5 grados de libertad y $\alpha = 0.025$
 T CALCUL. -0.2042
 LIMITES DE CONFIANZA = 99.5750 a 100.4983

CRITERIO DE ACEPTACION

Los límites de confianza para la media calculada del porcentaje de recobro al nivel de concentración del 100 %, incluye el valor de "100" . y siendo que t calculada es menor a t tablas, no existe diferencia significativa con el valor de cien, por lo tanto el método es exacto para el paracetamol en este nivel de concentración.

4.2.3. EXACTITUD

RESULTADOS.

NAPROXEN

mcg ADICIONADOS	mcg RECUPERADOS	AREA BAJO EL PICO	% RECUPERADO
9.9386	9.9485	36.3475	100.10
9.9146	10.0118	36.5793	100.98
9.9140	9.9969	36.5227	100.83
9.8987	9.8908	36.4387	99.92
9.8987	9.9472	36.6096	100.49
9.9386	9.9475	36.3432	100.09

ANALISIS DE RESULTADOS

\bar{X} = 100.4009
 D.E. = 0.4349
 C.V. = 0.4332
 T TABLAS = 2.5706 con 5 grados de libertad y $\alpha = 0.025$
 T CALCULADA = -0.2042
 LIMITES DE CONFIANZA = 99.9452 a 100.8581.

CRITERIO DE ACEPTACION

Los límites de confianza para la media calculada del porcentaje de recobro al nivel de concentración del 100 %, incluye el valor de "100", y siendo que t calculada es menor a t tablas no existe diferencia significativa con el valor de cien, por lo tanto el método es exacto para el naproxén en este nivel de concentración.

4.2.4. PRECISION

a) PRECISION DEL SISTEMA

PARACETAMOL

Resultados y Análisis de Resultados

AREA DEL PICO
19.2700
19.2428
19.2448
19.2653
19.2542
19.1768

MEDIA = 19.2423 C.V. (%) = 0.1760

CRITERIOS DE ACEPTACION

Ya que el C.V. < 1.5 % se cumple con el criterio para la precisión del sistema

b) PRECISION DEL METODO

RESULTADOS

QUIMICO

		1	2
D I A	1	101.2 100.62 99.22	100.77 99.99 102.16
	2	101.44 99.47 99.17	101.89 99.89 99.52

ANALISIS DE RESULTADOS.

TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
QUIMICO	1	0.8008	0.8008	22.0615	161.4
DIA	1	0.5547	0.5547	15.281	161.4
INTERACCION Q-D	1	0.0363	0.0363	0.00269	5.32

MEDIA TOTAL= 100.4450

C.V. TOTAL 1.0473

CRITERIO DE ACEPTACION

Repetibilidad.

El coeficiente de variación de los resultados obtenidos al inyectar una misma muestra, seis veces al sistema cromatográfico, es menor a 1.5 %, siendo entonces repetible.

Reproducibilidad.

El valor de F calculada por químico es menor a F de tablas con grados de libertad 1, 1 y $\alpha = 0.05$, así como también el valor de F calculada por día es menor al valor de F de tablas con grados de libertad 1,1 y $\alpha = 0.05$; y el valor de F calculada por interacción químico-día es menor al valor de F de tablas con grados de libertad 1.8 y $\alpha = 0.05$, por lo que el método resultó ser preciso, ya que no existe efecto sobre el resultado analítico de ninguna de las variables estudiadas.

4.2.4. PRECISION

a) PRECISION DEL SISTEMA NAPROXEN

Resultados y Análisis de Resultados

AREA DEL PICO
36.5246
36.4728
36.1366
36.1943
36.2612
35.7784

MEDIA = 36.2272 C.V. (%) = 0.7413

CRITERIOS DE ACEPTACION

Ya que el C.V. < 1.5 % se cumple con el criterio para la precisión del sistema

b) PRECISION DEL METODO

RESULTADOS

		QUIMICO	
		1	2
D I A	1	99.63	99.54
		98.97	99.05
		99.92	98.79
	2	99.70	99.70
		100.52	101.86
		98.14	99.51

ANALISIS DE RESULTADOS.

TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS D LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
QUIMICO	1	0.2054	0.2054	0.1663	161.4
DIA	1	1.0384	1.0384	0.8407	161.4
INTERACCION Q-D	1	1.2352	1.2352	1.3926	5.32

MEDIA TOTAL= 99.6108

C.V. TOTAL = 0.9366

CRITERIO DE ACEPTACION

Repetibilidad.

El coeficiente de variación de los resultados obtenidos al inyectar una misma muestra, seis veces al sistema cromatográfico, es menor a 1.5 %, siendo entonces repetible.

Reproducibilidad.

El valor de F calculada por el químico es menor a F de tablas con grados de libertad 1, 1 y $\alpha = 0.05$, así como también el valor de F calculada por día es menor al valor de F de tablas con grados de libertad 1,1 y $\alpha = 0.05$; y el valor de F calculada por interacción químico-día es menor al valor de F de tablas con grados de libertad 1,8 y $\alpha = 0.05$, por lo que el método resultó ser preciso, ya que no existe efecto sobre el resultado analítico de ninguna de las variables estudiadas.

4.2.5. TOLERANCIA DEL SISTEMA.

Al variar la composición de la fase móvil, así como el valor de pH, se observa que se presentan diversos cambios dependiendo de las variables modificadas. De esta forma, un cambio en la concentración de metanol en la fase móvil afecta de forma notable el tiempo de retención del paracetamol, en cambio, el tiempo de retención del naproxén no varía notablemente. Por el contrario, un cambio en la concentración de acetonitrilo en la fase móvil afecta el tiempo de retención de ambos compuestos, sin embargo afecta de forma más notable el tiempo de retención del naproxén. El pH afecta de manera más significativa el tiempo de retención del naproxén pero en cambio, no afecta el tiempo de retención del paracetamol. En cualquiera de los casos, los cambios ocasionados no afectan significativamente la resolución de ambos activos y de éstos con respecto al placebo, comparando con respecto a los datos obtenidos con la fase móvil sin modificar.

Al emplear una columna con menor número de platos teóricos (aprox 6300 platos teóricos) se observa una pérdida significativa de la resolución, observada entre los compuestos del placebo y el paracetamol. De esta forma, se hace necesario contar con una columna C_{18} con aprox 13,000 platos teóricos aproximadamente, para controlar éste parámetro. (Ver tabla 2).

De esta forma, se observa que los parámetros determinantes son el pH y la concentración de acetonitrilo en la fase móvil, pues a variaciones de éstos, los cambios en los tiempos de retención de los compuestos son más notables que los cambios hechos en la concentración de metanol, teniendo como consecuencia variaciones en las áreas bajo la curva obtenidas y la resolución, que a pesar de que no resultan ser críticos, es preferible mantener controlados, (ajuste de pH, No. de platos teóricos y concentración de acetonitrilo en la fase móvil).

CAP. IV. RESULTADOS Y DISCUSION 78

A continuación se muestra una tabla con los parámetros calculados empleados en la evaluación de la tolerancia.

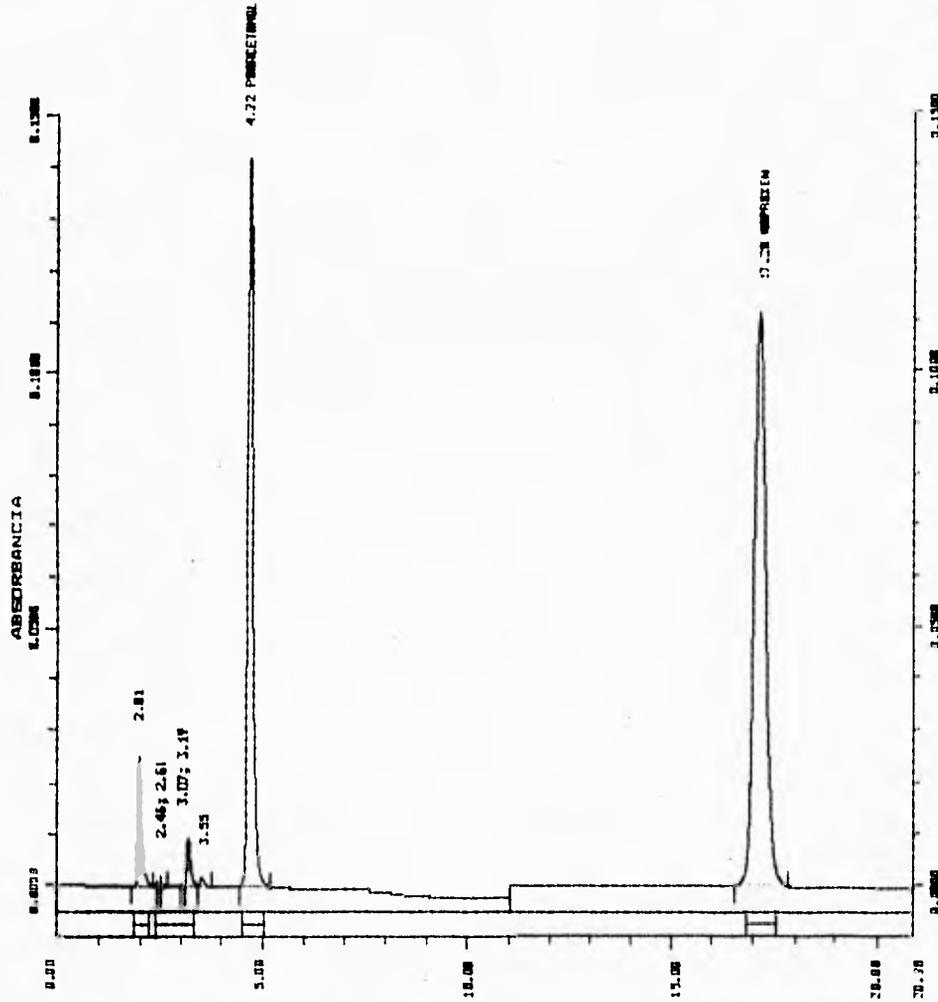
TOLERANCIA

VARIACION EN LA FASE MOVIL	t _r PARACETAMOL	t _r NAPROXEN	k _p	k _n	Rs _{p-n}	Rs _{p-pl}	α _{p-n}
NORMAL	4.69	17.50	0.9167	6.4640	26.0	4.6	4.17
pH = 6.5	4.65	20.16	0.9335	7.3650	28.8	4.2	4.38
pH = 7.5	4.69	17.03	0.9171	5.9493	29.7	4.8	3.62
- 10 % metanol	5.46	21.27	1.6668	7.4415	28.5	5.3	3.89
+ 10 % metanol	4.54	17.06	0.8847	6.0791	28.3	4.6	3.75
- 10 % acetonitrilo	5.22	22.22	1.1254	8.0315	27.7	4.5	4.25
+ 10% acetonitrilo	4.62	15.30	0.7462	4.7742	21.3	3.2	3.31
Columna Nova Pack C ₁₈ (aprox. 6,300 platos teóricos)	1.86	11.43	0.3205	7.1063	24.5	0.9	6.13

Tabla 2.- Fases móviles empleadas en la tolerancia del método.

donde:

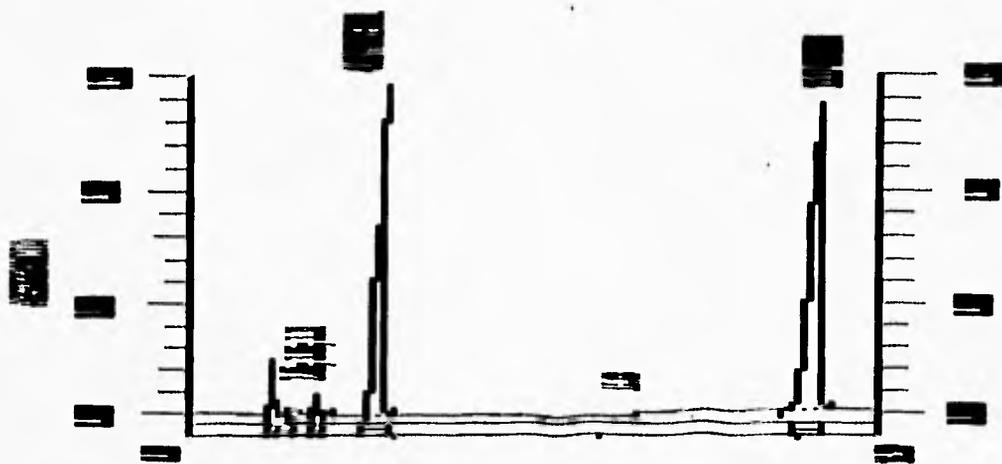
p = paracetamol; n = naproxén; pl = placebo



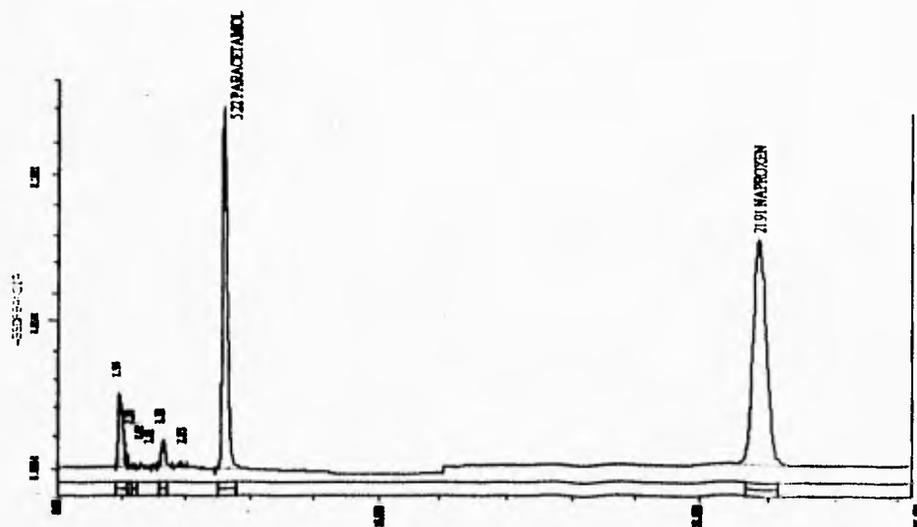
Cromatograma 1. : F.M.: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (800:100:100); pH = 7.0

FIG. 6. TOLERANCIA DEL METODO.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

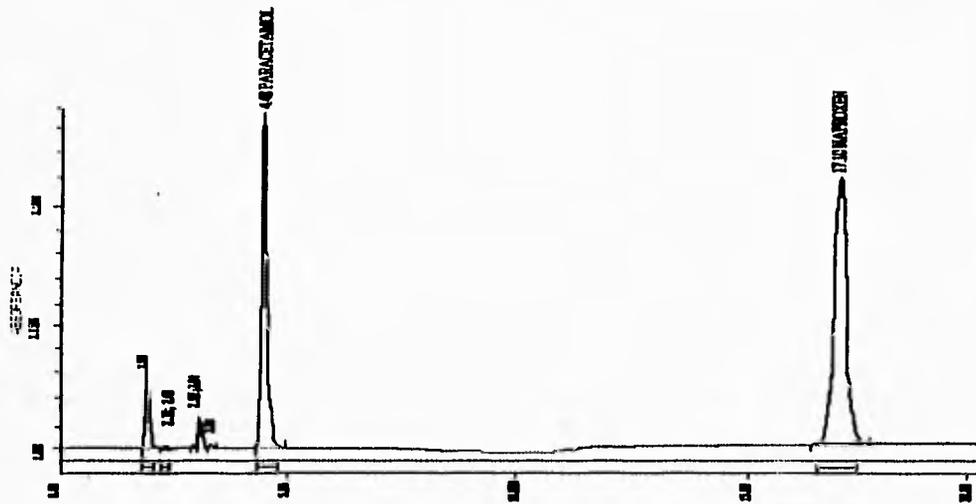


Cromatograma 2 : F.M.: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (790:100:110); pH= 7.0.

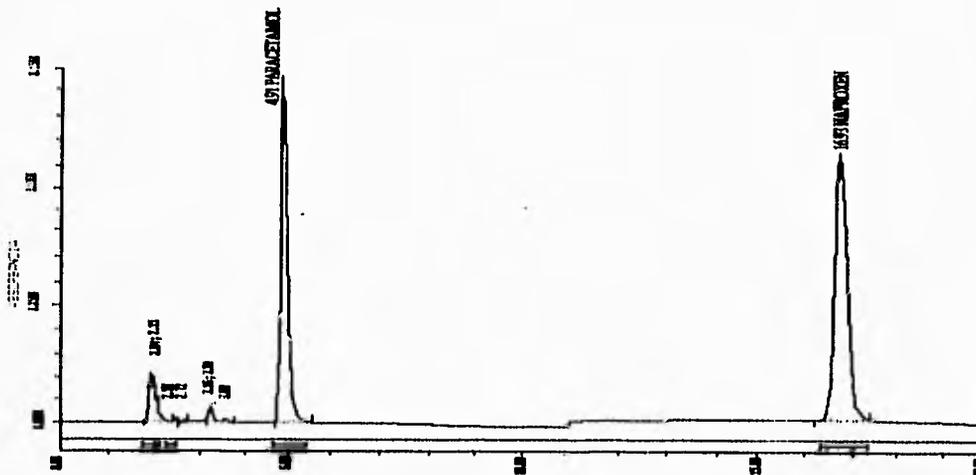


Cromatograma 3 : F.M.: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (810:100:90); pH= 7.0.

FIGURA 6.TOLERANCIA DEL METODO.

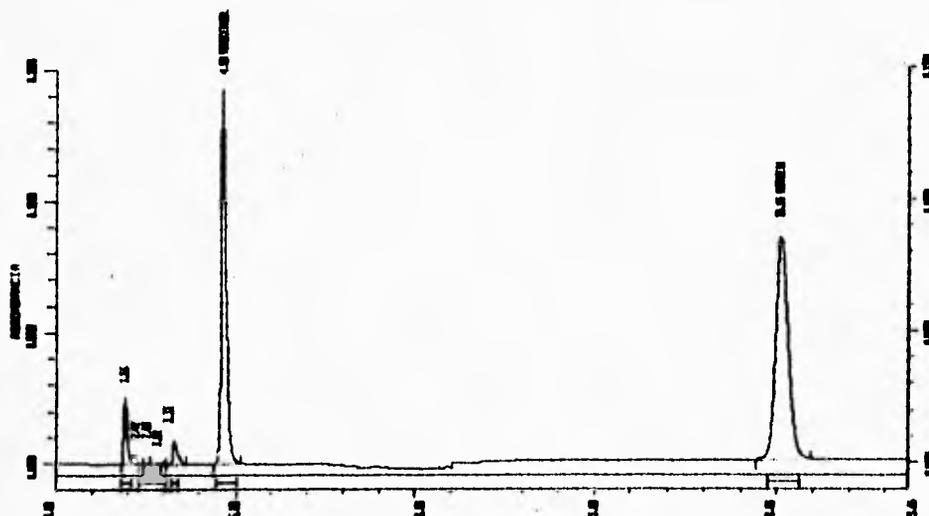


Cromatograma 4 : F.M.: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (790:110:100); pH= 7.0.



Cromatograma 5 : F.M.: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (810:90:100); pH= 7.0

FIGURA 6. TOLERANCIA DEL METODO.



Cromatograma 6 : F.M.: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (800:100:100); pH= 6.5.



Cromatograma 7 : F.M.: buffer de fosfatos:metanol:acetonitrilo (800:100:100); pH= 7.5.

FIG. 6. TOLERANCIA DEL METODO.

4.2.6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.**PARACETAMOL****CONDICION/TIEMPO**

MUESTRA	CONCENTRACION INICIAL	TEMP AMBIENTE 6 h	TEMP AMBIENTE 24 h
1	98.72	98.62	98.24
2	100.96	101.10	101.64
2	100.65	99.42	100.96

NAPROXEN**CONDICION/TIEMPO**

MUESTRA	CONCENTRACION INICIAL	TEMP AMBIENTE 6 h	TEMP AMBIENTE 24 h
1	100.18	99.97	99.96
2	99.89	99.75	99.79
2	100.29	100.31	99.80

ANALISIS DE RESULTADOS.**PARACETAMOL**

CONDICION/TIEMPO (h)	I.C.	I
6	-2.7642 a 1.9642	99.60
24	-2.7558 a 3.0958	100.16

NAPROXEN

CONDICION/TIEMPO (h)	I.C.	I
6	-0.5814 a 0.3614	99.89
24	-0.5760 a 0.0356	99.73

CRITERIO DE ACEPTACION.

La muestra de paracetamol es estable en condiciones ambientales por 6 y 24 h ya que el I.C incluye el valor de cero y el valor de I se encuentra dentro del intervalo de 98-102%, cumpliéndose lo mismo para el naproxén con las mismas condiciones

4.3. METODOLOGIA ANALITICA.

A continuación se describe el procedimiento experimental empleado en la metodología analítica para la cuantificación de paracetamol y naproxén en suspensión.

Preparación del buffer de fosfato monobásico de potasio.

Pesar exactamente alrededor de 6.8045 g de fosfato monobásico de potasio, y disolverlos en aproximadamente 800 ml de agua destilada. Diluir con agua a 1000 ml.

Preparación de la fase móvil.

En una probeta de 1000 ml colocar 800 ml de solución de buffer de fosfato monobásico de potasio y adicionar exactamente 100 ml de acetonitrilo grado cromatográfico, homogeneizar. Adicionar 100 de metanol grado cromatográfico y homogeneizar. Ajustar el pH a 7 +/- 0.01 unidades, con hidróxido de potasio al 10 %. Filtrar a través de membrana durapore de 0.45 micras y desgasificar en baño de ultrasonido durante 5 minutos.

Preparación de la solución de referencia.

Pesar exactamente 20 mg de paracetamol sustancia de referencia y 25 mg de naproxén sódico sustancia de referencia. Colocarlos en un matraz volumétrico de 100 ml. Adicionar 10 ml de metanol CLAR y 5 ml de hidróxido de sodio 0.1 N, agitar mecánicamente 10 minutos. Completar el aforo con agua destilada y homogeneizar. Esta solución contiene 2.0 mg/ml de paracetamol y 2.5 mg/ml de naproxén sódico.

Transferir una alícuota de 2 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml. aforar con fase móvil y homogeneizar. Esta solución contiene 8.0 mcg/ml y 10.0 mcg/ml de paracetamol y naproxén sódico respectivamente.

Preparación de la solución problema.

Reconstituir no menos de 10 frascos hasta la marca con agua destilada y determinar el volumen final de la suspensión, así como su densidad. De la suspensión homogeneizada (mezcla de los 10 frascos), tomar una alícuota equivalente a 100 mg de paracetamol y 125 mg de naproxén, y colocarla en un matraz volumétrico de 100 ml. Adicionar 10 ml de metanol CLAR y agitar manualmente. Adicionar 20 ml de hidróxido de sodio 0.1 N y agitar mecánicamente durante 10 minutos. Completar el aforo con agua destilada y homogeneizar. Filtrar la solución anterior a través de papel filtro Whatman No. 41, desechando los primeros mililitros del filtrado. De la solución filtrada, colocar una alícuota de 5 ml en un matraz volumétrico de 25 ml, aforar con agua y mezclar. De la solución anteriormente diluida tomar una alícuota de 2 ml y colocarla en un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con fase móvil y homogeneizar. Esta solución contiene 8.0 mcg/ml de paracetamol y 10.0 mcg/ml de naproxén

PROCEDIMIENTO

Una vez establecidos los parámetros de operación (pag. 42), proceder a inyectar la muestra, al menos por duplicado, y registrar las áreas bajo el pico correspondientes.

CAPITULO V. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el desarrollo y validación del método podemos concluir lo siguiente:

El método desarrollado permite cuantificar en una misma corrida cromatográfica y en un tiempo adecuado, activos, componentes del placebo y productos de degradación de manera específica, por lo que puede ser empleado para el control de calidad y pruebas de estabilidad del producto.

La técnica desarrollada, evita el empleo de métodos alternativos para un tratamiento previo de la muestra (extracción de los activos por ejemplo), evitando pérdida adicional de tiempo, recuperación reducida de alguno de los activos ó pérdida de sustancia.

El empleo de la programación de la bomba, fué de utilidad ya que, con esta condición, se modificó la elución de los compuestos y se logró optimizar el tiempo de analisis, evitando el empleo de gradientes.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos demuestra que, la linealidad, tanto del sistema como del método, presentan un comportamiento lineal y válido en el intervalo de concentraciones estudiado. Así mismo, se demostró que el método es exacto, preciso y reproducible para ambos activos. Tomando en cuenta lo anterior podemos decir que el Método Analítico, se considera capaz y efectivo de aplicarse a muestras sometidas en pruebas de estabilidad así como a producto terminado.

PROPUESTAS.

Cabe mencionar que las suspensiones son formas farmacéuticas complejas, que contienen varios activos, junto con varios edulcorantes, saborizantes, colorantes y conservadores, y que el método desarrollado fué validado para emplearse en la cuantificación del paracetamol y naproxén en una suspensión oral. Sin embargo es posible cuantificar de forma adecuada ambos activos en una misma corrida y en un tiempo de análisis corto en formas farmacéuticas menos complejas, como son las tabletas, empleando la fase móvil 6 del desarrollo del método analítico. Por lo que, las condiciones cromatográficas empleadas con esta fase móvil pueden ser empleadas como una alternativa en la selección de la fase móvil en el desarrollo de un método de control de calidad que cuantifique estos activos en tabletas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Advances in Chromatography.

Vol. 15. 1977. pag. 34

2. A.O.A.C. Official Methods of Analysis. (1990)

15a. edic. Vol.1. pag. 554.

3. British Pharmacopela. Vol.II. Her Majesty's Stationary Office at

The University Press, Cambridge. London (1988).

4. Clarke, E.G.C., et. al.

Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceutical. 2a. edición.

The Pharmaceutical Society of Great Britain. (1978).

5. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México A.C.

Validación de Métodos Analíticos. México.

6. Colín F. Poole and Sheila A. Shuette.

Contemporary Practice of Chromatography. 2a. edición.

Edit. Elsevier, Amsterdam 1984.

7. Colín F. Poole and Salwak K. Poole.

Chromatography Today. 2a. edición. Edit. Elsevier 1993.

8. "Determinación de p-aminofenol y Dietil p-aminofenol como Impurezas en Acetaminofén". Iyakuhi Kenkyu, Japan 1990, 21(3), p. 456-462.

9. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**. Quinta edición. Secretaría de Salud. (1988).

10. Florey, Klaus, et. al.
Analytical Profile of Drugs Substances.
Academic Press Inc. Vol. 3 y 4. U.S.A. 1986.

11. García de Marina, Adrián; Benito del Castillo.
Cromatografía de Alta Resolución.
Editorial Limusa S.A. de C.V. México 1978.

12. Gilpin, R.K., Yang, S.S. and Werner G. "A Recent Review of Secondary Mobile Phase Modifiers Used to Enhance the Chromatographic Analysis of Pharmaceutical". J. of Chromatographic Science, Vol. 26, pag. 388 a 400.

13. Goodman y Gilman.
Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7a. edición.
Edit. Médica Panamericana. México 1986. Cap. 29.

14. Lapique, F.; Netter, P. et. al. "Identification and Simoultaneous Determination of Non-Steroidai Anti-Inflammatory Drugs Using High Performance Liquid Chromatography". J. of Chromatography (1989). 496; 301-320.

15. Material de Apoyo al: "**Curso de Validación de Métodos Analíticos.**"

C.A.F.E.T.

16. Material de apoyo al "**Seminario de Validación en la Industria Farmacéutica**".

impartido por: Q.F.B. Norma Gonzalez, Q.F.B. Pedro Valadez y Q.F.B. Evelyn

Soberon. Asociación Farmacéutica Mexicana. Mayo 94.

17. **NAXEN**. Manual informativo para uso Médico.

Syntex Corporation. 1984.

18. Nielsen, F.; Kudsk. "HPLC- Determination of Some Antiinflammatory, Weak Analgesic and Uricosuric Drugs in Human Blood Plasma and its Application to Pharmacokinetics".

Acta Pharmacol. et Toxicol (1980) 47, 267-273.

19. Oliver, R.W.A.

H.P.L.C. Instrumentation.

IRL Press, Oxford University Press 1989.

20. Perry, S.G.; Amos, R.; Brewer, P.I.

Practical Liquid Chromatography.

Plenum/Rosetta edition, Nueva York 1972.

21. Ravindranath, B.

Principles and Practice of Chromatography.

Edit. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York 1989.

22. Rodriguez, C.R.

Vademécum Académico de Medicamentos. 1a. edición.

Tomo I y II. 1984.

23. Snyder, L.R.; Kirkland J.J.

Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2a. edición.

Edit. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, 1979.

24. Symonds, and Dedicat, H.

J. Ass. Publ. Analysts., 10(2), 54 (1972).

25. **The Pharmacopoeia of the United States of America. XXII**

United States Pharmacopoeial Convention, Inc., U.S.A. (1990)

26. **The United States Pharmacopoeia. National Formulary.**

U.S.P. XXII. N.F. XVII. Suplemento 8.

27. Toledano Granados, Teresa Magdalena.

**"Métodos Comparativos para Valoración de Naproxeno en Materia Prima y en
Tabletas"**. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. UNAM 1982. p. 3.4, 19-32.

28. Waters. **Sourcebook of Chromatography.** 1992.

Millipore Corporation, Milford U.S.A.

29. William R. Sisco, C. Todd Rittenhouse et al. "Simoultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Stability Indicating Analysis of Acetaminophen, Codeine Phosphato and Sodium Benzoate in Elixirs". J. of Chromatography, 354, 355-366.