



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

TESIS

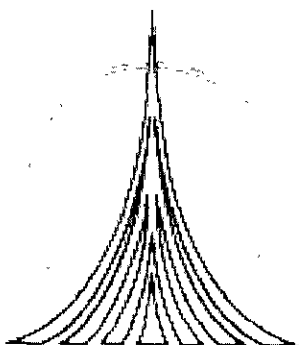
“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR ACETAMINOFÉN, PSEUDOEFEDRINA CLORHIDRATO Y CLORFENIRAMINA MALEATO EN SOLUCIÓN PEDIÁTRICA”

QUE PRESENTA

NICTE-HA ROSAS VELÁZQUEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA



2001

MÉXICO, D.F. 2001

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES “ZARAGOZA”



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.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR ACETAMINOFÉN, PSEUDOEFEDRINA
CLORHIDRATO Y CLORFENIRAMINA MALEATO EN SOLUCIÓN
PEDIÁTRICA

AUTORA

NICTE-HA ROSAS VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

QFB MIRIAM CORTÉS FUENTES

ASESOR DE TESIS

M EN C JUAN MANUEL RODRÍGUEZ

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

CENTRO A.F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS, S.A.

DEDICATORIA

A las personas que han confiado en mí y de las que he recibido apoyo incondicional

para cada uno de ustedes

Con cariño y agradecimiento, sinceramente.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	2
II-1 Monografías de los fármacos	2
II-1.1 Acetaminofén	2
II-1.2 Pseudoefedrina clorhidrato	8
II-1.3 Clorfeniramina maleato	11
II-2 Cromatografía	14
II-2.1 Cromatografía de líquidos	15
II-2.2 Cromatografía de par iónico	17
II-2.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	22
II-2.3 Conceptos básicos y terminología en cromatografía	28
II-3 Validación de métodos analíticos	32
II-3.1 Parámetros analíticos de validación	32
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
IV. OBJETIVO	40
V. HIPÓTESIS	40
VI. METODOLOGÍA	41
VI-1 Recursos materiales	41
VI-1.1 Reactivos	41
VI-1.2 Sustancias de referencia	41
VI-1.3 Formulación	42
VI-1.4 Placebo	42
VI-1.5 Material	42
VI-1.6 Equipo	42
VI-1.7 Equipo cromatográfico	43
VI-2 Metodología para el desarrollo del método analítico	44
VI-2.1 Sistema cromatográfico	44
VI-2.2 Método de cuantificación y volumen de inyección	45
VI-2.3 Especificidad del método analítico	46

VI-3 Metodología para la validación del método analítico	47
VI-3.1 Especificidad	47
VI-3.1.1 Especificidad a excipientes	47
VI-3.1.2 Especificidad a productos de degradación	47
VI-3.2 Linealidad del sistema	48
VI-3.3 Precisión del sistema	48
VI-3.4 Linealidad del método	49
VI-3.5 Exactitud del método	49
VI-3.6 Precisión del método	50
VI-3.6.1 Repetibilidad	50
VI-3.6.2 Precisión intermedia	50
VI-3.7 Intervalo	51
VI-3.8 Robustez	51
VI-3.8.1 Estabilidad de la muestra	51
VI-3.8.2 Tolerancia del sistema	51
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
VII-1 Desarrollo del método analítico	53
VII-1.1 Sistema cromatográfico	53
VII-1.2 Método de cuantificación y volumen de inyección	69
VII-1.3 Especificidad del método analítico	71
VII-1.4 Observaciones durante el desarrollo	76
VII-1.5 Método de análisis desarrollado	77
VII-2 Validación del método analítico	80
VII-2.1 Especificidad	80
VII-2.1.1 Especificidad a excipientes	80
VII-2.1.2 Especificidad a productos de degradación	82
VII-2.2 Linealidad del sistema	102
VII-2.3 Precisión del sistema	109
VII-2.4 Linealidad del método	111
VII-2.5 Exactitud del método	109
VII-2.6 Precisión del método	122
VII-2.6.1 Repetibilidad	122
VII-2.6.2 Precisión intermedia	122
VII-2.7 Intervalo	126
VII-2.8 Robustez	126
VII-2.8.1 Estabilidad de la muestra	126
VII-2.8.2 Tolerancia del sistema	128

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se requiere del desarrollo de métodos de análisis apropiados que cumplan con las normas de calidad establecidas en el lugar de comercialización, y que a su vez, sean confiables, específicos y capaces de cuantificar al principio activo en la formulación.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye la evaluación de la precisión, la linealidad, la exactitud y la especificidad del método; y proporciona una medida del comportamiento de éste.

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

En diversas fuentes bibliográficas, se reportan métodos de análisis que cuantifican acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato de manera individual o por separado el acetaminofén de la pseudoefedrina clorhidrato y la clorfeniramina maleato. Dichos métodos, no son indicadores de estabilidad e implican un complicado procesamiento de las muestras que, a menudo, incluye tediosas extracciones y en algunos casos, la adición de estándar interno.

En este trabajo de tesis se presenta el desarrollo y la validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), sencillo, específico e indicador de estabilidad que permite la cuantificación simultánea de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato en una solución pediátrica que se utiliza como analgésico, antihistamínico y descongestivo nasal.

II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

II-1 Monografías de los fármacos

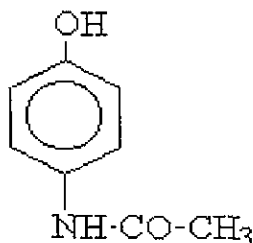
II-1.1 Acetaminofén

II-1.1.1 Nombres genéricos: Acetaminofén, Paracetamol. ¹⁻³

II-1.1.2 Nombres químicos: 4-Hidroxiacetanilida, p-Hidroxiacetanilida, p-Aceta-minofenol, p-Acetamidofenol, p-Acetylaminofenol, N-Acetyl-p-aminofenol, n-(4-hidroxifenil)- acetamida. ¹⁻⁴

II-1.1.3 Fórmula condensada: $C_8H_9NO_2$ ^{5,6}

II-1.1.4 Fórmula desarrollada ^{5,6}



II-1.1.5 Peso molecular: 151.16 g/mol. ^{5,6}

II-1.1.6 Descripción: Polvo cristalino blanco, inodoro, con un ligero sabor amargo. ^{1,3,5}

II-1.1.7 Punto de fusión: Entre 168 y 172 °C. ^{1,2}

II-1.1.8 Solubilidad

Soluble 1 en 7 de etanol, 1 en 13 de acetona, 1 en 20 de agua hirviendo, 1 en 70 de agua, muy ligeramente soluble en cloroformo, prácticamente insoluble en éter. ^{2,3}

II-1.1.9 pKa: 9.5 a 25 °C. ²

II-1.1.10 pH: Es un ácido débil, su solución saturada tiene un pH entre 5.1 y 6.5. a 25 °C. ^{1,5}

II-1.1.11 Espectro UV

Máximos de absorción: En agua neutra, aparece una banda mayor a 242 nm y una menor alrededor de 280 nm. La adición de ácido no afecta dichas bandas (*Figura 1*). En metanol neutro la banda principal aparece a 243 nm y su posición no es afectada por ácido; sin embargo, la adición de metóxido de sodio a la solución metanólica causa un salto hasta 262 nm debido a la ionización de acetaminofén en el ión p-acetaminofenolato(*Figura 2*). ⁷

II-1.1.12 Estabilidad

El acetaminofén es ligeramente sensible a la luz, siendo degradado por mecanismos que involucran la pre-disociación del enlace N-C como en el caso de la acetanilida. ¹

Seco y puro el acetaminofén es muy estable a temperaturas hasta de 45 °C pero, si se expone a condiciones de humedad en las cuales se hidroliza y se forma el p-aminofenol o si se tienen trazas de p-aminofenol, se muestran cambios en la coloración desde rosa hasta café y eventualmente hasta negro debidos a la ruptura del p-aminofenol a quinonimina y compuestos relacionados por medio de una reacción de oxidación. ¹

La degradación del acetaminofén en soluciones acuosas se presenta por catálisis ácida y básica. ¹

El acetaminofén es relativamente estable a la oxidación por el aire, a diferencia del producto de hidrólisis (p-aminofenol), por lo que se utiliza como antioxidante del caroteno en solución de aceite mineral, antioxidante y estabilizador en general.

Se ha reportado compatibilidad del acetaminofén con un amplio rango de excipientes. ¹

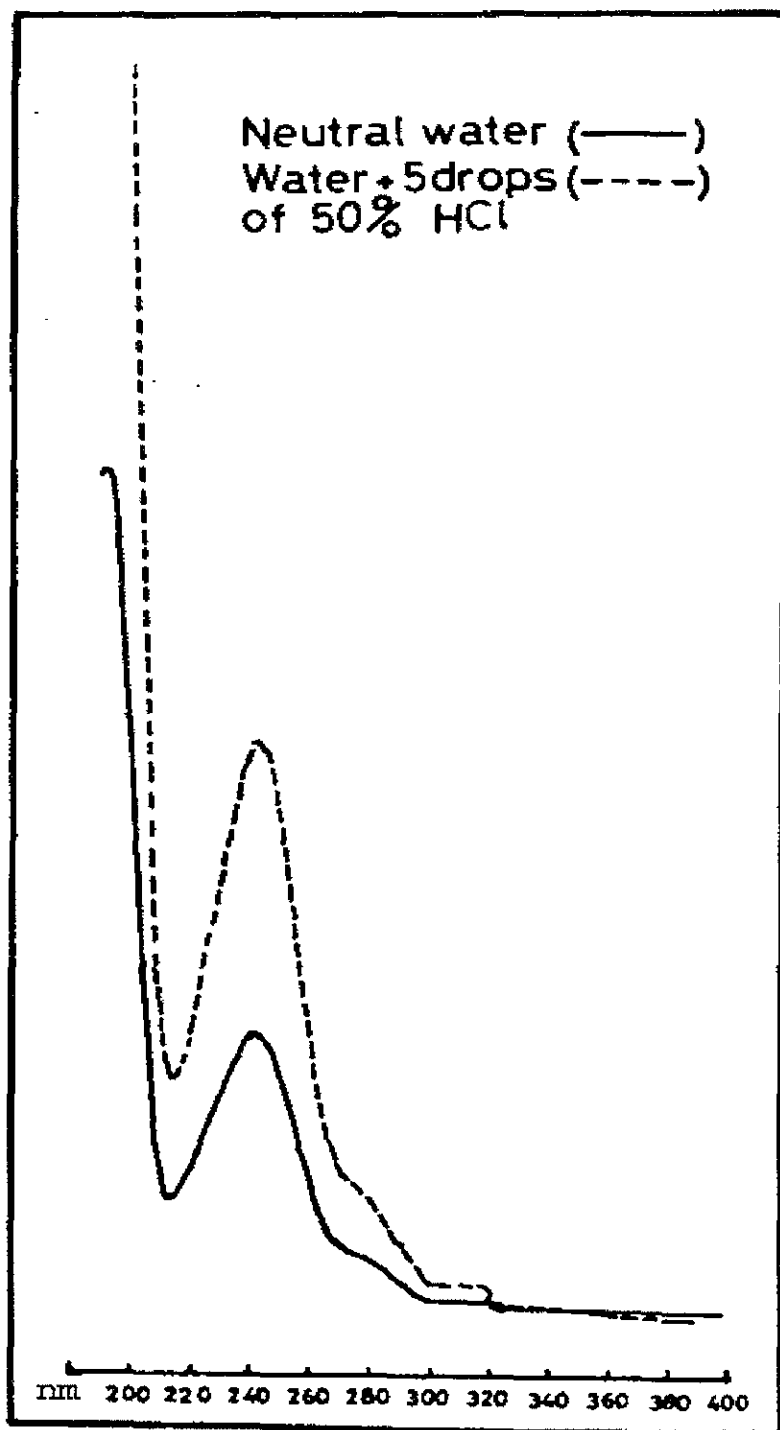


FIGURA 1
Espectro ultravioleta de acetaminofén

Fuente: Referencia 7

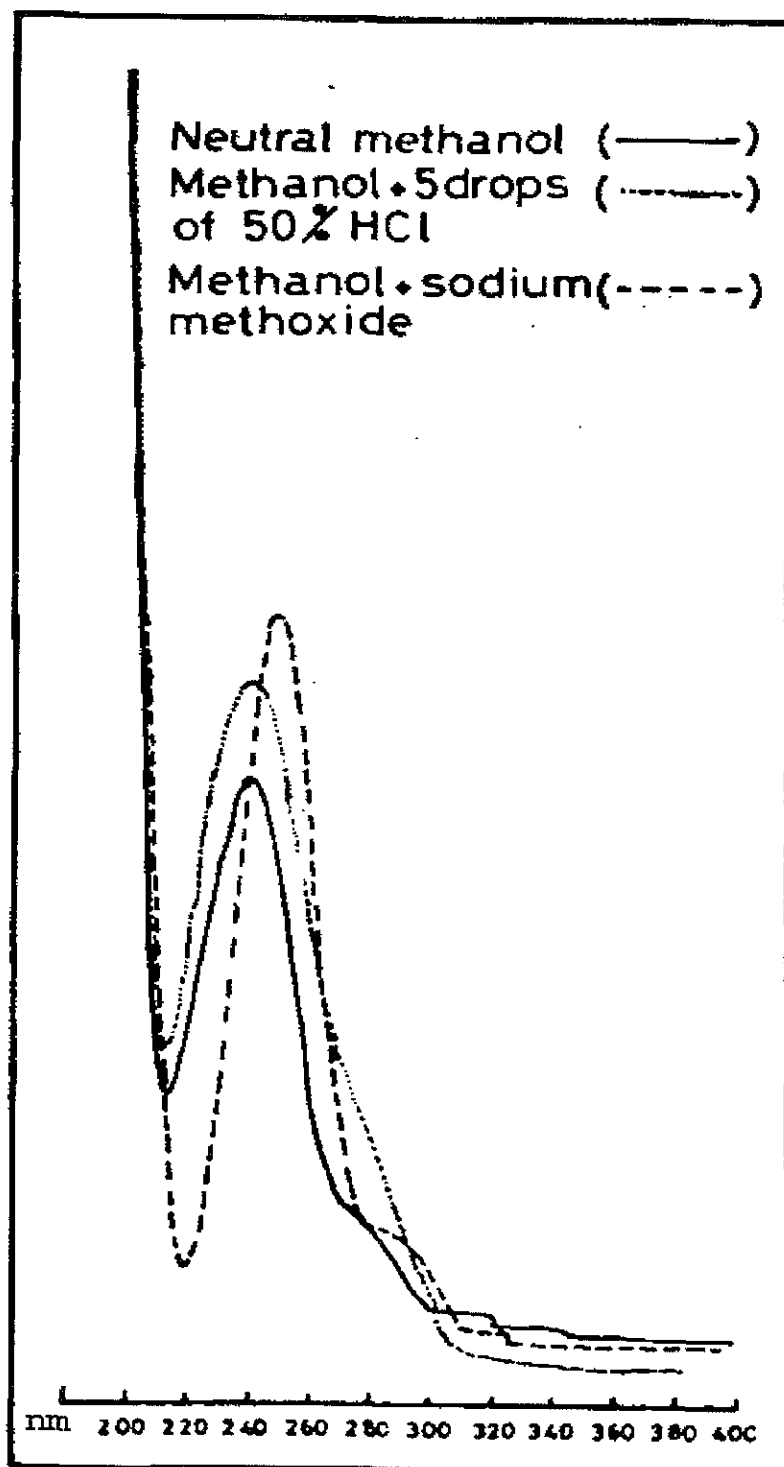


FIGURA 2
Espectro ultravioleta de acetaminofén

Fuente Referencia 7

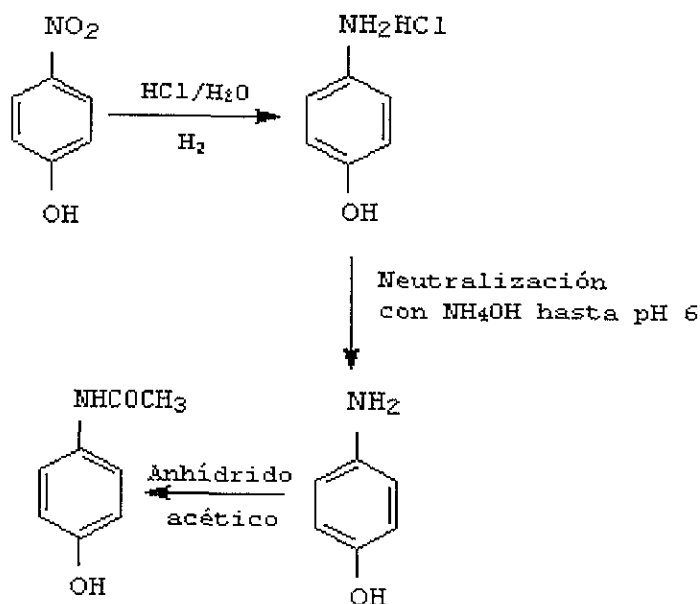
II-1.1.13 Síntesis

Fue sintetizado por primer vez por Morse en 1878 por la reducción del p-nitrofenol con estaño en ácido acético glacial. El p-aminofenol que se produce por la acción reductora del estaño no se aísla, siendo éste acetilado "in situ" por el ácido acético. Tingle y Williams siguieron la síntesis de Morse pero encontraron que es necesario incrementar la concentración de ácido acético al 100 % por medio de la adición de anhídrido acético.¹

Vignolo simplificó la síntesis empleando p-aminofenol como materia prima y acetilando con ácido acético. Friedlander modificó ligeramente este proceso acetilando el p-aminofenol (del p-nitrofenol) con anhídrido acético en lugar de ácido acético.¹

Se han descrito muchos métodos de preparación empleando la acetilación del p-aminofenol con ácido acético y /o anhídrido acético, y en algunos casos se ha adicionado también acetato de sodio anhidro. El p-aminofenol se ha producido por numerosas rutas incluyendo la reducción electrolítica del nitrobenzeno, la hidrogenación catalítica o directa del p-nitrofenol y la reducción sulfhídrica del p-nitrosofenol.¹

Una secuencia típica de la reacción es la siguiente:



II-1.1.14 Farmacología y farmacocinética

El acetaminofén presenta efectos antipiréticos, analgésicos y es un antiinflamatorio muy débil. Se encuentra dentro de los antiinflamatorios no esteroideos los cuales inhiben las actividades de la *ciclooxigenasa 1 (COX-1; constitutiva)* y *ciclooxigenasa 2 (COX-2; inducida en el sitio de la inflamación)* y con ello la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Se piensa que la inhibición de COX-2 media parcialmente las acciones antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias de los antiinflamatorios no esteroideos, pero la inhibición simultánea de COX-1 ocasiona efectos colaterales no deseados como los que culminan en úlceras gástricas que son consecuencia de la disminución en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Después de la administración oral de una dosis terapéutica, la concentración plasmática máxima es de 5-20 µg/mL en 30-60 minutos 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 varía de 1-3 h. Se distribuye en todos los líquidos corporales y se elimina en la orina en 24 h. Su biotransformación se lleva a cabo en el hígado mediante reacciones de síntesis o conjugación y sólo en una mínima parte por oxidación. En caso de disminuir la conjugación, la oxidación puede aumentar dando lugar a metabolitos tóxicos.^{3,8,9}

II-1.1.15 Métodos de análisis mas utilizados

El acetaminofén puede ser analizado por diversos métodos, tales como los gravimétricos, polarográficos, titulaciones ácido-base, espectrofotométricos, etc., pero los reportados con más frecuencia en la literatura, son los métodos de análisis por CLAR con detectores de luz ultravioleta.¹

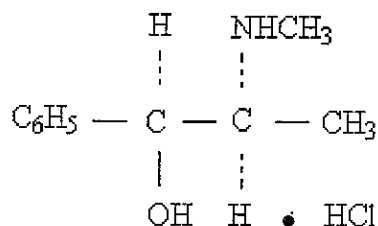
II-1.2 Pseudoefedrina clorhidrato

II-1.2.1 Nombres genéricos: Pseudoefedrina hidroclorada, Efedrina hidroclorada, Isoefedrina hidroclorada. ^{2,3}

II-1.2.2 Nombres químicos: Bencenometanol, Clorhidrato de α -[1-(metilamino)etil] [S-(R*,R*)], Clorhidrato de (+)-pseudoefedrina, (+)-Threo- α -(1-(metilamino)etil) bencil alcohol hidroclorado. ^{3-6,10}

II-1.2.3 Fórmula condensada: $C_{10}H_{15}NO \cdot HCl$ ^{3-6,10}

II-1.2.4 Fórmula desarrollada ^{3-6,10}



II-1.2.5 Peso molecular: 201.7 g/mol. ^{2,3,5}

II-1.2.6 Descripción: Cristales o polvo fino blanco o casi blanco, con un ligero olor característico. ^{3,5,10}

II-1.2.7 Punto de fusión: Entre 182 y 186 °C, siendo el rango de fusión desde el inicio hasta el fin de no más de 2 °C. ^{5,6}

II-1.2.8 Solubilidad

Soluble 1 en 1.6 de agua, 1 en 4 de etanol, 1 en 60 de cloroformo y ligeramente soluble en éter. ²

II-1.2.9 pKa: 9.8 ⁵

II-1.2.10 pH: Entre 4.6 y 6 en solución 1:20 ^{5,3,6}

II-1.2.11 Espectro UV

Máximos de absorción en solución ácida y etanol.- 208, 251, 257 y 264 nm. Sin desplazamiento de las bandas en soluciones alcalinas (*Figura 3*).^{2,10}

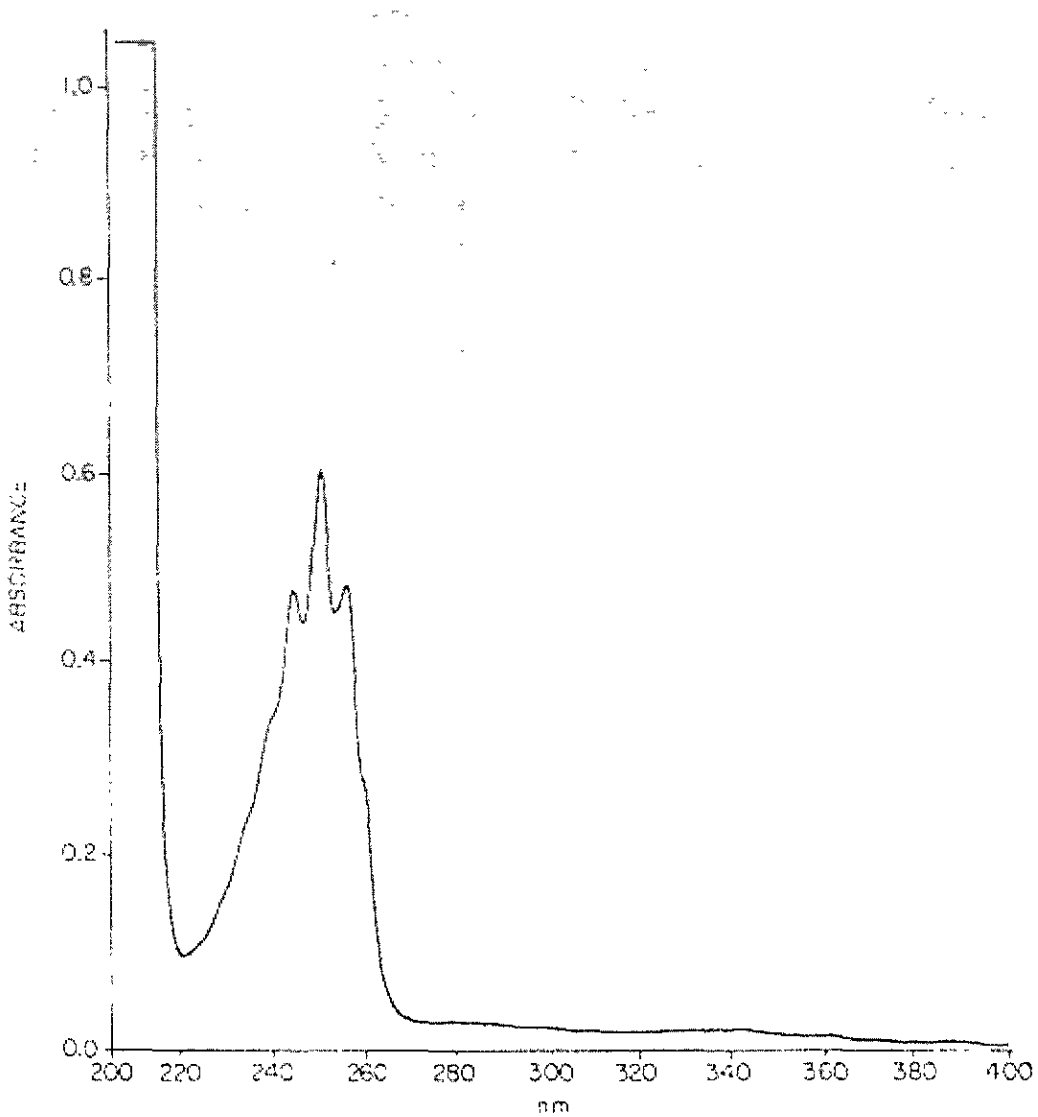


FIGURA 3
Espectro ultravioleta de pseudoefedrina clorhidrato

Fuente: Referencia 10

II-1.2.12 Estabilidad

La pseudoefedrina clorhidrato es considerada como un compuesto estable a granel y en formulaciones. Después de 4 semanas bajo luz fluorescente y ultravioleta no se observa decoloración o degradación química. La pseudoefedrina clorhidrato a granel se presenta estable durante 6 meses a 37 °C y durante 3 meses a 50 °C. Las formulaciones de tabletas y jarabes a 15-30 °C por 5 años no muestran degradación.¹⁰

II-1.2.13 Síntesis

La pseudoefedrina clorhidrato se prepara por el rearrreglo de Welsh de la l-efedrina hidrociorada con anhídrido acético seguido por acetilación con ácido clorhídrico. La l-efedrina puede ser resuelta de la dl-efedrina con ácido l-mandélico. La l-efedrina se da naturalmente en algunas plantas de la especie Ma Huang.¹⁰

II-1.2.14 Farmacología y farmacocinética

La pseudoefedrina clorhidrato se usa como descongestivo nasal usualmente en dosis de 60 mg 3 o 4 veces al día. Algunas preparaciones farmacéuticas se administran a una dosis de 120 mg cada 12 h. La dosis sugerida para niños es de 1 mg por kilogramo de peso corporal 4 veces al día. La pseudoefedrina se absorbe en el tracto gastrointestinal, es resistente al metabolismo por monoaminooxidasa y es excretada en su mayoría sin cambios en la orina junto con pequeñas cantidades de sus metabolitos hepáticos. Su vida media es de 5 a 8 h y se relaciona de manera proporcional con el pH urinario (a mayor pH urinario, mayor tiempo de vida media).^{2,3,10}

II-1.2.15 Métodos de análisis más utilizados

La pseudoefedrina clorhidrato puede ser analizada por diversos métodos, tales como los espectrofotométricos, colorimétricos, cromatográficos de diferentes tipos, entre lo cuales, los reportados con más frecuencia en la literatura, son los métodos de análisis de cromatografía en capa fina, de gases y por CLAR con detectores de luz ultravioleta.¹⁰

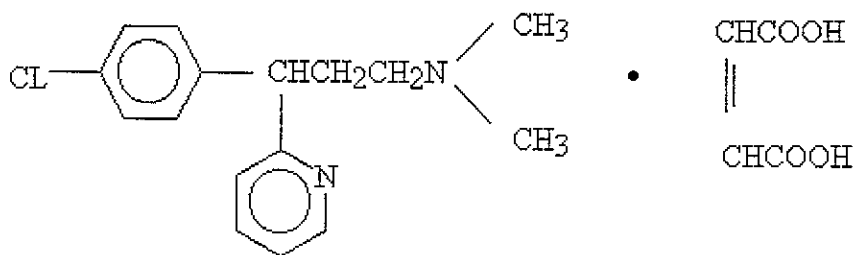
II-1.3 Clorfeniramina maleato

II-1.3.1 Nombre genérico: Clorfeniramina maleato. ^{3,5}

II-1.3.2 Nombres químicos: Maleato de 2-[p-cloro- α -(2-dimetilaminoetil)encil] piridina, Maleato de 3(4-clorofenil)-3-(2-piridil)propildimetilamina, Maleato de 2-piridinpropanamina. ^{3-5,11}

II-1.3.3 Fórmula Condensada: $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ ¹¹

II-1.3.4 Fórmula Desarrollada ¹¹



II-1.3.5 Peso molecular: 390.9 g/mol. ^{2,3,5}

II-1.3.6 Descripción: Polvo blanco cristalino inodoro. ^{2,3,5,11}

II-1.3.7 Punto de fusión: Entre 130 y 135 °C. ^{2,5,6}

II-1.3.8 Solubilidad

Soluble 1 en 4 de agua, 1 en 10 de etanol, 1 en 10 de cloroformo y ligeramente soluble en éter. ²

II-1.3.9 pKa: 9.1 a 25 °C. ²

II-1.3.10 pH: Entre 4 y 5 en solución al 1.0 %. ^{3,5}

II-1.3.11 Espectro UV

Máximos de absorción.- 265 nm en solución ácida y 262 nm en solución alcalina (Figura 4).²

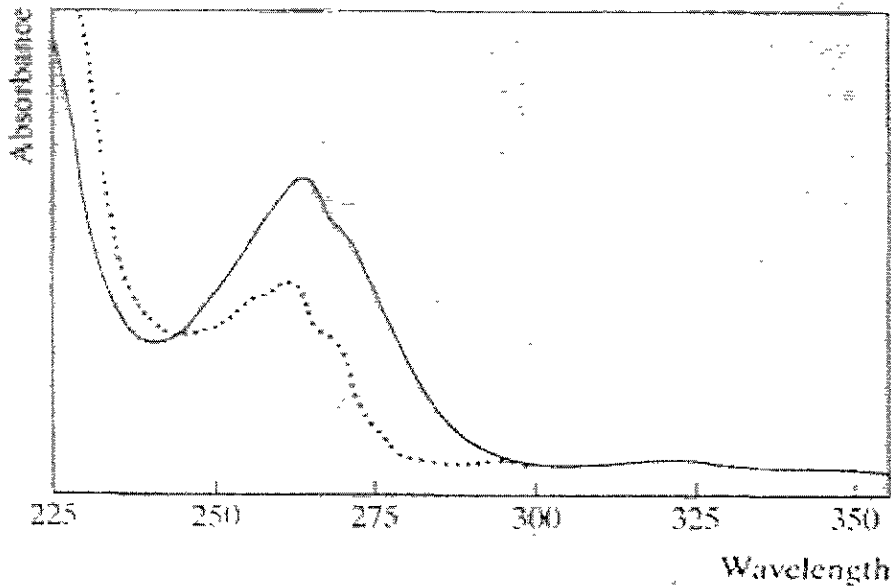


FIGURA 4
Espectro ultravioleta de clorfeniramina maleato
Solución ácida —, solución alcalina ---

Fuente: Referencia 2

II-1.3.12 Estabilidad

Es estable a cambios de pH entre 2 y 13, se obtienen recobros mayores al 95 % de una solución que contiene 30 mg de clorfeniramina maleato en 10 mL de buffer.¹¹

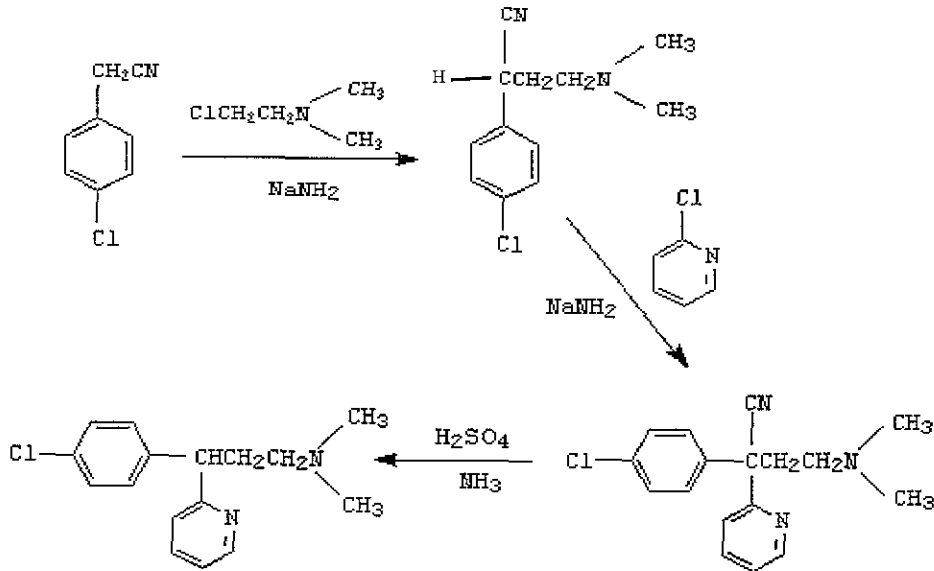
Es estable a la exposición de la luz.¹¹

II-1.3.13 Métodos de análisis más utilizados

La clorfeniramina maleato puede ser analizada por diversos métodos, tales como los espectrofotométricos, titulaciones ácido-base, polarográficos y CLAR por partición y por intercambio iónico, los cuales son los reportados con más frecuencia en la literatura.¹¹

II-1.3.14 Síntesis

La siguiente síntesis se utiliza frecuentemente para producir clorfeniramina maleato:



Fuente: Referencia 11

II-1.3.15 Farmacología y farmacocinética

Es un fármaco antihistamínico sintético perteneciente al grupo de las alquilaminas. Es uno de los antihistamínicos más potentes y causa grado moderado de sedación. La mayoría de sus efectos farmacológicos se le atribuyen a la acción bloqueadora competitiva que ejerce sobre los receptores de la histamina, con selectividad por el receptor histaminérgico 1 (H₁). Esta sustancia es capaz de antagonizar la mayoría de los efectos característicos de la histamina, mediados por el receptor H₁ sin modificar los efectos mediados por el receptor H₂.^{3,8}

Generalmente la dosis utilizada es de 4 mg 3 o 4 veces al día. En dosis elevadas se dan hasta 36 mg diarios en preparaciones especiales. No es recomendada para niños menores de 2 años.^{3,8}

Se absorbe bien a nivel gastrointestinal y los efectos farmacológicos se hacen presentes de los 20 a los 30 min, con máximos entre 1 y 2 h, persistiendo hasta por 4 h. Se une en un 70 % a las proteínas y se distribuye ampliamente en todo el organismo incluyendo el SNC. El fármaco se metaboliza a nivel hepático, hidroxilándose y conjugándose con ácido glucurónico. Se excreta por la orina.^{3,8}

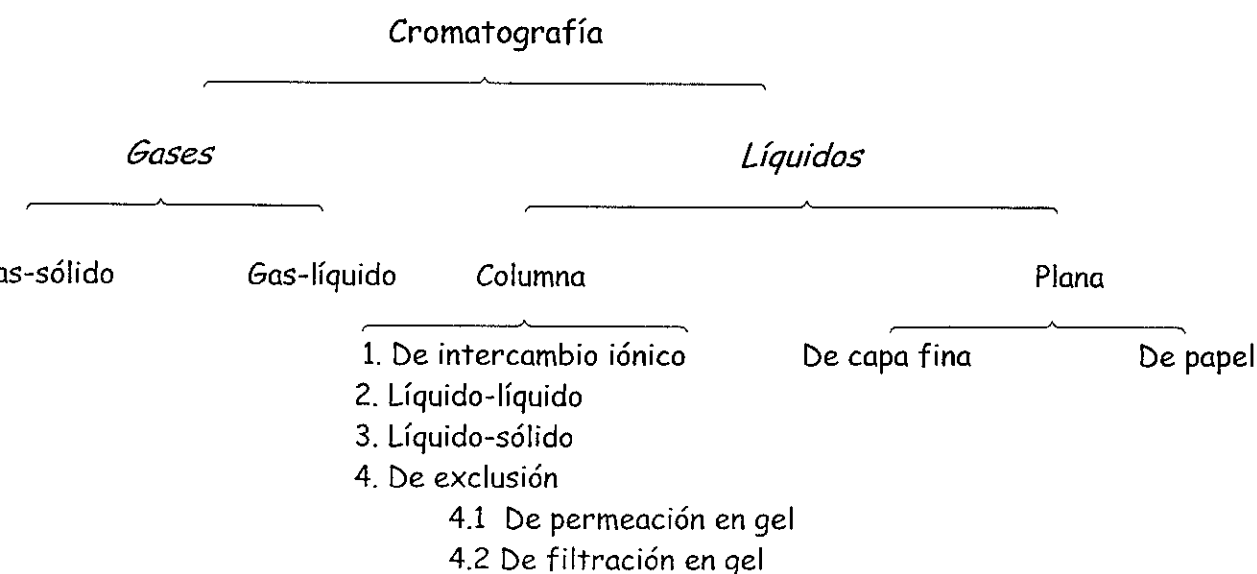
II-2 Cromatografía

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases; una de ellas es la fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra una fase estacionaria, la cual puede ser un líquido, un gel o un sólido.¹²

Los compuestos a ser separados poseen diferentes afinidades relativas por la fase estacionaria y por la fase móvil, de manera que un compuesto con afinidad relativamente alta a la fase estacionaria se moverá con una velocidad menor a través del sistema cromatográfico que una sustancia con una afinidad menor a ésta. Tales diferencias en velocidad de migración son las que permiten una separación física de los componentes de una muestra.¹³

Con base en la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se divide en cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, los cuales a su vez se subdividen de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria como se muestra en el siguiente diagrama:^{13,14}

Clasificación de cromatografía de acuerdo a la naturaleza de las fases



II-2.1 Cromatografía de líquidos

II-2.1.1 Clasificación 1

En cuanto a los mecanismos de retención, la cromatografía de líquidos se puede considerar de cuatro tipos: ^{6,12,13,15}

a) *Cromatografía de adsorción*

La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente del analito de manera reversible; la separación se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos de la superficie de la fase estacionaria. ^{6,12,13,15}

b) *Cromatografía de partición*

Ambas fases son líquidos, pero el líquido de la fase estacionaria se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y poroso. El mecanismo de separación se basa en la partición de los solutos entre las dos fases y por lo tanto depende de las diferencias entre sus coeficientes de reparto. ^{6,12,13,15}

Una derivación de este tipo de cromatografía, es la *cromatografía de par iónico*, de la cual se hablará en un capítulo aparte, por ser el mecanismo de separación más importante en éste trabajo de tesis.

c) *Cromatografía de intercambio iónico*

La fase estacionaria tiene grupos iónicos de carga opuesta a la de la muestra y a la de los contraiones que generalmente están en la fase móvil líquida en forma de sales con determinado pH. ^{6,12,13,15}

Por intercambio iónico con los contraiones, cuanto mayor sea la carga de la muestra, ésta será más fuertemente atraída hacia la superficie iónica de la fase estacionaria, y por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. ^{6,12,13,15}

d) Cromatografía de exclusión

La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es un material con poros de dimensiones moleculares según los compuestos que se quieran separar; así, la separación se da por diferencia de tamaño molecular.^{6,12,13,15}

Si el material de la fase estacionaria es un gel reticulado se denomina filtración en gel y si es un polímero rígido se denomina permeación en gel.^{6,12,13,15}

II-2.1.2 Clasificación 2

La cromatografía de líquidos también se clasifica según sea la polaridad relativa de las dos fases y la preponderancia de los fenómenos de adsorción o reparto:^{6,12,13,15}

a) Cromatografía de fase normal

La fase estacionaria es de naturaleza fuertemente polar, como sílice, y la fase móvil es no polar, como hexano o tetrahidrofurano. Las muestras polares quedan retenidas en la columna (fase estacionaria) durante mayor tiempo que los compuestos menos polares o no polares.^{6,12,13,15}

b) Cromatografía de fase reversa

Es el proceso inverso, en el cual, la fase estacionaria es no polar, como hidrocarburos, y la fase móvil es un líquido polar; cuanto menos polar sea la muestra, mayor será su retención.^{6,12,13,15}

II-2.2 Cromatografía de par iónico

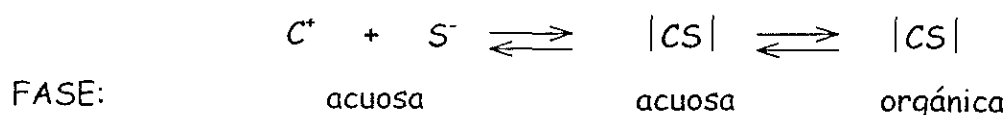
Existen numerosos compuestos de interés farmacéutico que son ionizables, esto es, tienen un carácter hidrofílico que los hace difíciles de extraer por procedimientos clásicos. En consecuencia, el análisis de dichas sustancias presenta dificultades, sobre todo en la especificidad y en la precisión, por lo que, se han desarrollado técnicas de extracción por par iónico para su análisis.¹⁶

La extracción por par iónico se basa en la formación de un complejo entre la sustancia de interés y un contraión proporcionado por un reactivo apropiado. Este complejo (par iónico) posee una carga neutra y es soluble en el disolvente de extracción. La selectividad y la gran cantidad de compuestos farmacéuticos que se pueden extraer por esta técnica originaron su aplicación en cromatografía.¹⁶

La cromatografía por par iónico es una forma especializada de cromatografía de partición que puede usarse para la separación de compuestos ionizables, así como para la resolución de mezclas de compuestos ionizables y no ionizables; puede además incrementar la sensibilidad de la detección mediante el uso de un contraión que sea cromóforo cuando se encuentre formando un complejo con el ión de la sustancia de interés, la cual no sea cromófora.¹⁶

Un par iónico es una especie que resulta de una asociación por fuerzas de Coulomb entre dos iones de cargas eléctricas opuestas, es decir, entre la sustancia de interés y el contraión. El contraión es un ácido o una base débil que se caracteriza por estar constituido por una región polar ionizable y una región no polar. Se han propuesto diversos modelos para explicar el proceso de cromatografía por par iónico.¹⁶

El primer modelo es una extrapolación directa de la teoría de extracción líquido-líquido por par iónico, que establece que el soluto ionizado forma un par iónico con un contraión de carga opuesta. El par iónico es soluble en la fase orgánica del sistema cromatográfico. El mecanismo se puede expresar de la siguiente manera:



opuesta. Los iones de la sustancia de interés, que se encuentran en la capa secundaria son atraídos por la capa primaria, neutralizando una carga en este proceso; para restaurar el equilibrio, el contraión es adsorbido en la superficie. El movimiento del ión de la sustancia de interés y el contraión ocurren como eventos individuales y no necesariamente como un par iónico. Uno de los usos de este modelo es la explicación del por qué la adición a la fase móvil de modificadores que consisten en compuestos ionizables similares al compuesto de interés, originando una reducción en el factor de capacidad e interviniendo en la simetría del pico. En esta explicación, el modificador de carga y características similares a la sustancia de interés, se comportan siguiendo un mecanismo de exclusión de carga sobre la superficie de la fase estacionaria.¹⁶

II-2.2.1 Factores que afectan la cromatografía de par iónico

a) Características del contraión

El tipo, tamaño y concentración de contraión, son factores importantes para la separación. El tipo de contraión depende de la sustancia de interés, así como de su clasificación como ácido o base débil. El contraión es adicionado en forma de un reactivo de contraión; en cromatografía de fase reversa por par iónico, existe la posibilidad de seleccionar un contraión a partir de una gran variedad de compuestos similares, cuya diferencia radica principalmente en el tamaño de la región hidrofóbica. Durante la optimización de cada separación es importante considerar la hidrofobicidad del contraión, pues a medida que la hidrofobicidad aumenta, se incrementa también el factor de capacidad. El efecto de hidrofobicidad debe ser aplicado cuidadosamente pues podría ocurrir que la retención del contraión supere a la retención del par iónico.¹⁶

b) Concentración del contraión

La concentración del contraión depende de los diversos factores que operan durante la separación. En general, al aumentar la concentración del contraión, aumenta la retención; si esta concentración se sigue manteniendo, la retención disminuye; la explicación a esto es que a medida que se incrementa la

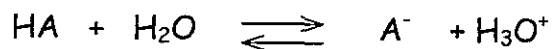
concentración del contraión, la aglomeración de las moléculas se hace significativa. Esta aglomeración reduce la eficiencia del par iónico porque sólo algunas moléculas pueden interactuar con la sustancia de interés.¹⁶

Debe tomarse en cuenta que las aminas cuaternarias usadas en altas concentraciones pueden solubilizar el empaque de la columna por la saturación de la fase móvil con la sílice, por lo que, es recomendable utilizar una precolumna para minimizar dicho efecto.¹⁶

El contraión no deberá interferir con la detección, excepto cuando se use para incrementar la respuesta del detector. El contraión no debe estar sujeto a ningún equilibrio secundario.¹⁶

c) Efecto del pH

La selectividad de los solutos iónicos en cromatografía de par iónico, depende en gran medida del pH. Esta dependencia es una consecuencia directa del equilibrio de protonación en el que se puede encontrar la sustancia de interés y el contraión. Por ejemplo, si la sustancia de interés es un ácido débil HA, el equilibrio de disociación en medio acuoso será:



donde la concentración efectiva de la forma aniónica dependerá del pH elegido. El soluto y el contraión se distribuirán entre la fase móvil y la fase estacionaria, dependiendo del pH de la fase acuosa.¹⁶

El equilibrio de ionización también se verá afectado por la temperatura, incrementando o disminuyendo los valores de pK. Para asegurar la reproducibilidad, resulta apropiado amortiguar la fase móvil a una temperatura constante.¹⁶

d) Efecto de la fuerza iónica en el factor de capacidad (k')

Si la concentración del amortiguador en la fase móvil es muy elevada, puede originarse una fuerza iónica excesiva, generándose una competencia entre los iones del amortiguador y el contraión que es adsorbido en la fase estacionaria,

lo que origina una reducción en la eficiencia del sistema. Una competencia similar puede ocurrir con la formación de pares iónicos en la fase móvil.¹⁶

Si la concentración del contraión es muy elevada, las moléculas del contraión pueden interactuar entre sí, evitando la formación de pares iónicos con la sustancia de interés, lo cual se refleja en una disminución en la eficiencia.¹⁶

La fuerza iónica influirá en la k' de un soluto: un incremento en la concentración originará una disminución en los valores de k' .¹⁶

e) Efecto de la temperatura

La temperatura es una variable importante en la cromatografía de par iónico debido a que influye en la partición de un soluto entre dos fases inmiscibles. Un incremento en la temperatura de la columna se asocia generalmente a una disminución de k' del par iónico. De aquí que, las variaciones de la temperatura ambiente puedan reflejarse en una reproducibilidad pobre de k' . La temperatura puede ser usada con el fin de optimizar la separación. Por lo tanto esta debe fijarse o permanecer constante.¹⁶

II-2.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es un tipo de cromatografía de líquidos que tiene como fase estacionaria un sólido pulverizado, con partículas de tamaño entre 3 y 40 μm , empacado en una columna de diámetro muy pequeño y con una alta eficiencia, pero también una elevada resistencia al flujo, por lo que se utilizan altas presiones de bombeo de la fase móvil para atravesar la columna. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña por lo que se requiere que la cantidad de muestra también sea pequeña (entre 1 y 100 μL).¹⁷⁻¹⁹

Las interacciones de los solutos con la fase móvil y estacionaria pueden ser manipuladas a través de diferentes selecciones de columnas (reutilizables por bastante tiempo) y solventes. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución cuenta con un equipo de detección altamente especializado que proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale de la columna. Como resultado, este tipo de cromatografía adquiere un alto grado de versatilidad no encontrado en otros sistemas cromatográficos, con la capacidad de separar fácilmente una amplia variedad de mezclas químicas.¹⁷⁻¹⁹

II-2.3.1 Partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Las partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución son: el reservorio para la fase móvil, la bomba, el inyector, la columna, el detector y el registrador o integrador.^{12,17,19-23}

a) Reservorio para la fase móvil

Es el recipiente que contiene la fase móvil, debe ser de una composición tal que no interactúe con ésta, su forma y tipo puede variar desde un frasco común hasta un sistema capaz de filtrar, termo regular y / o desgasificar el disolvente.^{12,17,19-23}

b) Bomba

Es el dispositivo capaz de proporcionar a la fase móvil el flujo o velocidad precisa para introducirla al sistema y atravesar la columna a presiones de hasta 6000 psi. ^{12,17,19-23}

Las bombas más utilizadas son las de movimiento alternado o bombas reciprocantes que mantienen la velocidad constante de la fase móvil por medio de pistones que impulsan al disolvente. La ventaja de este tipo de bombas es que con ellas se pueden utilizar disolventes sin límite de volumen; además, su reducido volumen interno las hace ideales para la elución por gradiente, es decir, se puede variar la composición de la fase móvil. ^{12,17,19-23}

c) Inyector

Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución al sistema, sin interrumpir el caudal de la fase móvil. El inyector debe ser fácil de operar, inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones, debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra que introduce al sistema, debe inyectar la muestra en forma de un paquete compacto con el propósito de obtener una máxima eficiencia en la separación. ^{12,17,19-23}

Los inyectores CLAR tienen válvulas que pueden accionarse de manera manual o automática, y que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según sea su posición, a través de un serpentín en el cual se introduce la solución a inyectar. Los inyectores automáticos contienen además un dispositivo, que generalmente es un carrusel para viales que contienen las muestras a inyectar. ^{12,17,19-23}

d) Detector

Sirve para monitorear de manera continua los eluyentes de la columna permitiendo una evaluación cualitativa y/o cuantitativa. ^{12,17,19-23}

Los detectores disponibles en la actualidad para cromatografía de líquidos permiten una amplia variedad de aplicaciones, y raras veces la aplicación de la cromatografía de líquidos está limitada seriamente por el detector. ^{12,17,19-23}

d-1) Clasificación de los detectores CLAR

- Detectores diferenciales

Proporcionan una medida diferencial de una propiedad "gruesa" que poseen tanto el soluto como la fase móvil. Estos detectores generalmente no son específicos y responden a una amplia gama de compuestos.^{12,17,19-23}

El detector de índice de refracción se encuentra dentro de esta categoría.

- Detectores de propiedades del soluto o detectores específicos

Miden una propiedad de la muestra que no posee la fase móvil. Los detectores ultravioleta y de fluorescencia caen dentro de esta categoría.^{12,17,19-23}

d-2) Detectores más comunes

- Detector de índice de refracción

Mide las diferencias de los índices de refracción del disolvente puro y la solución de la muestra que sale de la columna. Es de respuesta universal y tiene una sensibilidad moderada ($\mu\text{g-ppm}$)^{12,17,19-23}

- Detector de fluorescencia

Es el más sensible y posee alta selectividad de respuesta a compuestos fluorescentes y a sus derivados fluorescentes.^{12,17,19-23}

- Detector de ultravioleta-visible

Es el detector más utilizado en CLAR ya que tiene una alta sensibilidad para muchos compuestos, si estos absorben en el espectro ultravioleta o visible (190-600nm). Estos detectores no destruyen las muestras, son relativamente insensibles a cambios en el flujo del disolvente, a la temperatura y a los cambios de composición de la fase móvil, por lo que resultan apropiados también para elución en gradiente.^{12,17,19-23}

La base de su funcionamiento es la existencia de una relación entre la concentración de la muestra y la absorción de la luz al pasarle un haz de luz monocromática.^{12,17,19-23}

- *Detector de arreglo de fotodiodos*

Cubre longitudes de onda de ultravioleta, visible e infrarrojo cercano simultáneamente, por lo que se obtiene un cromatograma tridimensional (absorbancia, tiempo y longitud de onda).^{12,17,19-23}

Cuando la luz proveniente de una lámpara de deuterio incide sobre los fotodiodos, la energía luminosa para cada longitud de onda no llega a un fotodiodo en particular, sino que éstos están dispuestos en tal forma que sólo reciben la energía luminosa correspondiente a un intervalo pequeño de longitud de onda del total del espectro.^{12,17,19-23}

Los fotodiodos al recibir la señal luminosa se descargan en cierta medida. La descarga de los fotodiodos es directamente proporcional a la cantidad de muestra y por consiguiente a su absorbancia.^{12,17,19-23}

Cada fotodiodo produce una señal análoga, la cual es directamente proporcional a la cantidad de luz que recibe.^{12,17,19-23}

La longitud de onda de la luz que recibe un fotodiodo en particular es determinada por la posición relativa del diodo respecto a la posición del monocromador de difracción.^{12,17,19-23}

Este tipo de detectores aunados a una computadora, son capaces de almacenar todos los datos que genera el estudio, de acuerdo a las especificaciones que se establezcan para el análisis.^{12,17,19-23}

e) Precolumna

Es una columna de menor tamaño que se coloca inmediatamente antes de la columna. Su función es aumentar el tiempo de vida de la columna, eliminando toda la suciedad que pudiera traer la muestra y que daña la columna. Se utiliza sobre todo en cromatografía de líquidos de par iónico y de supresión iónica, las cuales usan fases móviles generalmente amortiguadas con diversos ácidos, bases o sales que las vuelven más agresivas de las que se usan con otros tipos de cromatografías.^{12,17,19-23}

f) Columna

Es la parte más importante del sistema cromatográfico, pues es en ella donde se lleva a cabo la separación. Las características de la columna, el material de empaque, las dimensiones, etc., dependerán del tipo de separación que se requiera. Las más comunes son las de acero inoxidable, con diámetro interno generalmente entre 2 y 5 mm. Están rellenas de partículas porosas de tamaño de 3 a 40 μm con una distribución de tamaños no mayores a $\pm 2 \mu\text{m}$; en general, son de gel de sílice recubierta de grupos Si-OH y Si-O-Si que pueden interaccionar con las moléculas de la muestra. El relleno, idealmente, debe producir la máxima resolución en el menor tiempo, debe tener la máxima capacidad de muestra, ser fácilmente empacable, resistir flujos a altas presiones y ser económico.^{12,17,19-23}

En la *Tabla 1* se muestran diferentes tipos de empaque recomendables de acuerdo al método cromatográfico.

g) Registrador o Integrador

Es un sistema de registro de la respuesta del detector, que la transforma en un cromatograma que en muchas ocasiones es necesario integrar para cuantificar la muestra. La integración puede ser de diferentes formas según el equipo.^{12,17,19-23}

TABLA 1

Tipos de empaque recomendables de acuerdo al método cromatográfico

Método cromatográfico	Tipo de empaque	Descripción
Fase reversa y Par iónico	C-18, octadecil, ODS	Alta capacidad de retención, fácilmente disponible.
	C-8, octil	Menor capacidad de retención que C-18, fácilmente disponible.
	C-3, C-4	Menor capacidad de retención, usada principalmente para péptidos y proteínas.
	C-1, TMS	Menor capacidad de retención, menor estabilidad.
	Fenil	Capacidad de retención moderada, algunas diferencias en selectividad.
	CN, ciano	Capacidad de retención moderada, usada en fase normal y reversa.
	NH ₂ , amino	Capacidad de retención débil, usada para carbohidratos, menos estable.
	Poliestireno	Estable a pH de 1 a 13, mejor forma de picos y tiempo de vida mayor para algunas separaciones.
Fase normal	CN, ciano	Muy polar.
	OH, diol	Más polar que CN.
	NH ₂ , amino	Altamente polar, menos estable.
	Sílice	Barata, usada en cromatografía preparativa.
Exclusión	Sílice	Con capacidad de adsorción.
	Sílice silanizada	Menor capacidad de adsorción, amplia compatibilidad con disolventes, usada con disolventes orgánicos.
	OH, diol	Menos estable, usada en filtración en gel acuosa.
	Poliestireno	Usada ampliamente en filtración en gel acuosa, incompatible con disolventes muy polares.
Intercambio iónico	Fase unida	Menos estable y reproducible.
	Poliestireno	Menos eficiente, menos reproducible, estable.

II-2.3 Conceptos básicos y terminología en cromatografía

II-2.3.1 Tiempo de retención (t_R)

Es el tiempo que transcurre desde que la muestra se introduce al sistema hasta el momento en el que se obtiene el punto máximo del pico, este valor es característico de la muestra, en la misma columna y bajo las mismas condiciones de trabajo (*Figura 5*).^{5,6,17,19,24}

El tiempo de retención puede cambiar a volumen de retención al multiplicar el tiempo por el caudal de la fase móvil.^{5,6,17,19,24}

II-2.3.2 Tiempo muerto (t_0 ó t_M)

Es el tiempo requerido para eluir una muestra que no es retenida y que por lo tanto eluye a la velocidad de la fase móvil; se mide desde el momento que es introducida al sistema hasta el momento en que sale de la columna (*Figura 5*).^{5,6,17,19,24}

II-2.3.3 Número de platos teóricos (N)

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.^{5,6,17,19,24}

La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos, éstos miden el ensanchamiento de la banda del soluto de la muestra a medida que pasa a través de la columna.^{5,6,17,19,24}

Los platos teóricos se calculan directamente del cromatograma y, dependiendo de la altura a la que se tome la anchura del pico, existen varios métodos para su cuantificación (*Figura 5*).^{5,6,17,19,24}

Método de las tangentes.-

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{Wb} \right)^2$$

donde:

N = número de platos teóricos

t_R = tiempo de retención del soluto [=] min

W_b = ancho del pico extrapolando los lados del pico a la línea base [=] min

II-2.3.4 Altura equivalente a un plato teórico (HEPT)

Es la longitud de columna necesaria para generar un plato teórico. ^{5,6,17,19,24}

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

donde:

HEPT = altura equivalente a un plato teórico

L = longitud de la columna

N = número de platos teóricos

II-2.3.5 Factor de capacidad (k')

Indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de una muestra en la columna. La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo t_r , mientras t_0 representa el tiempo que permanece en la fase móvil, por lo tanto el cociente entre ambos nos dará el valor de k' . Este factor depende de la naturaleza química y temperatura de las fases líquidas que conforman el sistema. El valor de k' generalmente está entre 0 y 10; valores mayores implican tiempos excesivos para completar la separación (*Figura 5*). ^{5,6,17,19,24}

$$k' = \frac{t_R}{t_0} - 1$$

donde:

k' = factor de capacidad

t_R = tiempo de retención del soluto

t_0 = tiempo muerto

II-2.3.6 Factor de selectividad (α)

Es una medida de la distribución diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. Depende de la afinidad de cada compuesto por la fase estacionaria y por la fase móvil. Así, una menor afinidad por la fase móvil, produce una mayor retención en la fase estacionaria; por lo tanto, si el valor de $\alpha = 1$ los dos compuestos tienen afinidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realiza la separación; así, mientras más elevados sean los valores de α , mayor será la selectividad de la fase estacionaria y más fácil la separación. ^{5,6,17,19,24}

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

donde:

α = factor de selectividad

k'_1 = factor de capacidad del soluto 1

k'_2 = factor de capacidad del soluto 2

II-2.3.7 Factor de coleo (T)

Se refiere a la simetría del pico; para un pico simétrico, el factor de coleo tiene el valor de 1, por lo que a medida que se difiere de este valor, la asimetría aumenta (*Figura 5*). ^{5,6,17,19,24}

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

donde:

$W_{0.05}$ = ancho del pico al 5% de la altura del pico [=] cm

f = trazando una línea perpendicular del vértice a la línea base del pico, f es la longitud medida desde la línea izquierda del pico hasta la bisectriz del pico al 5% de su altura [=] cm

II-2.3.8 Resolución (R)

Es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos compuestos y es definida como la distancia que hay entre el centro de picos dividida entre el promedio de las anchuras de los mismos. ^{5,6,17,19,24}

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

donde:

R = resolución

t_1 y t_2 = tiempo de retención del soluto 1 y 2 respectivamente en minutos

w_1 y w_2 = ancho de los picos en minutos

Una resolución igual a 1 se considera como una separación completa aunque en realidad está al 98%. Si $R = 1.5$ se dice que la resolución es completa, con una sobreposición de 0.3%. ^{5,6,17,19,24}

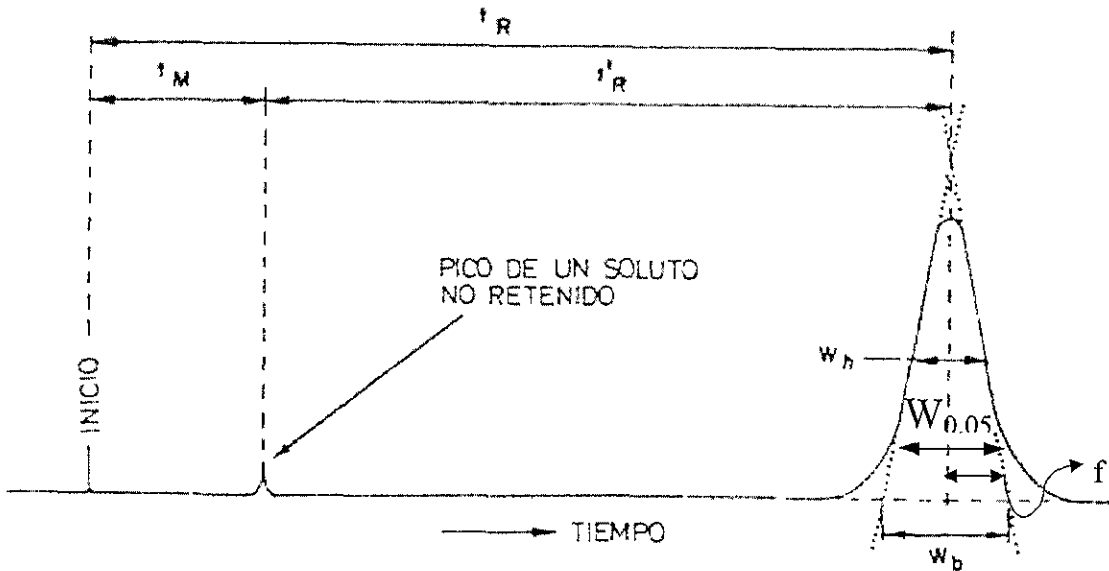


FIGURA 5
Cromatograma típico

Fuente: Referencia 15

II-3 Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico se define como la evidencia experimental documentada, por la cual, queda establecido que: la capacidad del método analítico satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos.

Generalmente, se evalúan los siguientes parámetros analíticos:

1. Especificidad
2. Linealidad del sistema
3. Precisión del sistema
4. Linealidad del método
5. Exactitud del método
6. Precisión del método
 - 6.1 Repetibilidad
 - 6.2 Precisión intermedia
7. Intervalo
8. Robustez
 - 8.1 Estabilidad de la muestra
 - 8.2 Tolerancia del sistema

II-3.1 Parámetros analíticos de validación

II-3.1.1 Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para separar y cuantificar de manera exclusiva el compuesto de interés en presencia de otros componentes de la muestra.

Se demuestra estableciendo experimentalmente que los excipientes y sustancias relacionadas al (los) principio (s) activo (s), como precursores de síntesis, impurezas o productos de degradación, no interfieren con la medición. En un análisis espectral, las señales cromatográficas del compuesto de interés deben ser puras.

Cuando las impurezas o productos de degradación no son conocidos, la especificidad se demuestra degradando entre 10 y 30 % las (s) molécula (s) de interés en la formulación y obteniendo los primeros y más importantes productos de degradación del principio activo a través de reacciones controladas de degradación como hidrólisis ácida y básica, oxidación y fotólisis.

II-3.1.2 Linealidad del sistema

Al evaluar la linealidad del sistema se asegura que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo especificado.

Se evalúa al determinar la relación que existe entre la concentración del analito (x) y su respuesta de medición (y), al preparar una curva con un número apropiado de niveles y de réplicas por nivel en un intervalo de concentración definido.

Con los datos obtenidos se realiza un análisis de regresión lineal, obteniéndose:

- Ordenada al origen (b)
- Pendiente (m)
- Coeficiente de determinación (r^2)
- Intervalo de confianza para la ordenada al origen
- Número de datos (n), promedio, desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) del factor respuesta (respuesta / concentración).

Criterio de aceptación:

El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0.98, y el coeficiente de variación del factor respuesta debe ser menor o igual que 2.0 %.

II-3.1.3 Precisión del sistema

Es el grado de concordancia en los resultados individuales probados cuando el procedimiento se aplica repetidamente.

Se determina evaluando por sextuplicado una réplica del nivel al 100 % de la solución de referencia indicada por el método analítico; el coeficiente de variación de las respuestas debe ser menor o igual que 1.5 %.

II-3.1.4 Linealidad del método

Es la capacidad del sistema para asegurar que una cantidad conocida de principio activo que se adiciona a la matriz es directamente proporcional a la cantidad recuperada del analito con el método de análisis propuesto, mostrando un comportamiento lineal ($y = mx + b$).

Se evalúa determinando la relación que existe entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y) del analito, al aplicar el método a placebos cargados preparando una curva con un número apropiado de niveles y de réplicas por nivel en un intervalo de concentración definido.

Con los datos obtenidos se realiza un análisis de regresión lineal obteniéndose:

- Ordenada al origen (b)
- Pendiente (m)
- Coeficiente de determinación (r^2)
- Porcentaje recuperado, número de datos (n), promedio, desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV)
- Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen, la pendiente y el porcentaje recuperado.

Criterio de aceptación:

El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente a uno con un intervalo de confianza al 95 %. El promedio del porcentaje recuperado, así como el intervalo de confianza al 95 %, deben encontrarse entre 98.0 y 102.0 % y el coeficiente de variación debe de ser menor o igual que 2.0 %.

II-3.1.5 Exactitud del método

Es el grado de concordancia entre los datos obtenidos con el método analítico y el valor real.

Se determina al aplicar el método a placebos cargados al 100 % establecido por el método analítico y obteniendo el porcentaje del analito recuperado.

Se calcula el porcentaje recuperado, número de datos (n) y promedio del porcentaje recuperado.

Criterios de aceptación:

El promedio del porcentaje recuperado debe encontrarse entre 98.0 y 102.0 %.

II-3.1.6 Precisión del método

Es el grado de concordancia entre los resultados individuales probados cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra homogénea. Se expresa en términos de: repetibilidad y reproducibilidad.

a) Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un analista bajo las mismas condiciones experimentales.

Se evalúa al aplicar el método a placebos cargados al 100 % establecido por el método analítico y calculando el coeficiente de variación del porcentaje recuperado de las réplicas analizadas.

Criterio de aceptación:

El coeficiente de variación debe ser menor o igual que 2.0 %.

b) Reproducibilidad (Precisión intermedia)

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas a una muestra homogénea por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo o en diferentes laboratorios utilizando el mismo o diferentes aparatos.

Para cada día de análisis y para los resultados globales, se calcula el porcentaje cuantificado, promedio, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

Criterio de aceptación:

El coeficiente de variación del porcentaje cuantificado, para cada día de análisis y el global no debe ser mayor que 2.0 %.

II-3.1.7 Intervalo

Se define por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración inferior y superior de analito en la muestra (incluyendo estos niveles), en las cuales se demuestra que el método analítico es lineal, preciso y exacto.

II-3.1.8 Robustez

Es la habilidad de un método analítico para mantener su confiabilidad sin ser afectado por variaciones pequeñas, pero premeditadas, en los parámetros del método durante su uso habitual.

a) Estabilidad de la muestra

Es el tiempo en el cual se demuestra que una muestra preparada y lista para ser analizada según el método, no sufre alteración alguna para su cuantificación durante su almacenamiento bajo condiciones específicas.

Para cada día de análisis se calcula el porcentaje cuantificado, el promedio, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

Así mismo, se calcula la diferencia relativa entre el promedio del porcentaje cuantificado en el primer día de análisis con respecto al promedio del porcentaje cuantificado de cada uno de los demás días de análisis propuestos.

Criterio de aceptación:

La diferencia relativa de los promedios del porcentaje cuantificado para cada día de análisis, respecto al tiempo cero no debe ser mayor que 2.0 %.

b) Tolerancia del sistema

Es la capacidad que tiene un método analítico para mantener su confiabilidad bajo pequeños pero deliberados cambios en los parámetros del método durante su uso habitual.

Se evalúa al procesar muestras de la formulación según el método y al analizarlas junto con muestras de placebo y degradadas por oxidación e hidrólisis ácida y básica, en cada una de las condiciones probables de cambio y en las condiciones originales del método; midiendo la cantidad cuantificada de principio activo y los parámetros cromatográficos de cada cambio y la condición original.

Se calcula el promedio del porcentaje cuantificado de las muestras analizadas en cada una de las condiciones probadas y en la condición original y se obtiene la diferencia relativa para cada condición respecto a la original. Durante la tolerancia del sistema se establecen algunos parámetros cromatográficos para la adecuación del sistema del método propuesto, tales como: Factor de capacidad (k'), eficiencia de la columna (N) y factor de retención (T).

Criterio de aceptación:

La diferencia relativa del promedio del porcentaje cuantificado obtenido de las muestras analizadas en cada una de las condiciones, respecto al promedio del porcentaje cuantificado de las muestras analizadas en las condiciones originales, no debe ser mayor que 2.0 %.

Las muestras de placebo no deben presentar señales que interfieran con los compuestos de interés.

Las muestras degradadas por oxidación e hidrólisis ácida y básica, no deben presentar señales que interfieran con los compuestos de interés.

En un análisis espectral, las señales cromatográficas de los compuestos de interés deben ser puras.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria farmacéutica es un requisito asegurar que los productos farmacéuticos cumplan con las normas de calidad establecidas en el lugar de comercialización. Para cumplir con estas regulaciones, es necesario contar con métodos analíticos confiables, específicos y capaces de cuantificar cada uno de los activos que se encuentran en el medicamento.

En diversas fuentes bibliográficas, se reportan métodos de análisis que cuantifican acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato de manera individual o por separado el acetaminofén de la pseudoefedrina clorhidrato y la clorfeniramina maleato. Dichos métodos, no son indicadores de estabilidad e implican un complicado procesamiento de las muestras que, a menudo, incluye tediosas extracciones y en algunos casos, la adición de estándar interno.

Respondiendo a lo anterior y debido a que se desea tener en el laboratorio un método analítico por CLAR sencillo y que permita cuantificar simultáneamente, al acetaminofén, a la pseudoefedrina clorhidrato y a la clorfeniramina maleato en presencia de diversos excipientes, tales como: conservadores, colorantes, saborizantes y edulcorantes entre otros, y en presencia de productos de degradación en una solución pediátrica como: producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad; se desarrollará y validará un método analítico específico e indicador de estabilidad, que permitirá cuantificar simultáneamente, de manera rápida, sencilla y confiable a dichos compuestos.

IV. OBJETIVO

Desarrollar y validar un método analítico por CLAR sencillo, específico e indicador de estabilidad que, al aplicarlo en una solución pediátrica como: producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad, permita cuantificar simultáneamente al acetaminofén, a la pseudoefedrina clorhidrato y a la clorfeniramina maleato en concentraciones de 3.2g, 0.3g, 0.02g / 100 mL respectivamente.

V. HIPÓTESIS

Con base a las propiedades fisicoquímicas del acetaminofén, de la pseudoefedrina clorhidrato y de la clorfeniramina maleato, se podrá desarrollar un método analítico por CLAR de fase reversa y sistema de elución por gradiente, que permitirá cuantificar simultáneamente y de manera efectiva, confiable, rápida y sencilla a dichos compuestos, proporcionando la especificidad necesaria para el análisis de éstos en presencia de excipientes y productos de degradación.

IV. OBJETIVO

Desarrollar y validar un método analítico por CLAR sencillo, específico e indicador de estabilidad que, al aplicarlo en una solución pediátrica como: producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad, permita cuantificar simultáneamente al acetaminofén, a la pseudoefedrina clorhidrato y a la clorfeniramina maleato en concentraciones de 3.2g, 0.3g, 0.02g / 100 mL respectivamente.

V. HIPÓTESIS

Con base a las propiedades fisicoquímicas del acetaminofén, de la pseudoefedrina clorhidrato y de la clorfeniramina maleato, se podrá desarrollar un método analítico por CLAR de fase reversa y sistema de elución por gradiente, que permitirá cuantificar simultáneamente y de manera efectiva, confiable, rápida y sencilla a dichos compuestos, proporcionando la especificidad necesaria para el análisis de éstos en presencia de excipientes y productos de degradación.

VI. METODOLOGÍA

VI-1 Recursos materiales

VI-1.1 Reactivos

Reactivo	Grado	Marca	Número de lote
Acetonitrilo	HPLC	Caledón	35392
		Caledón	35356
		Fermont	026502
		Fermont	035104
		Fermont	635404
Fosfato monobásico de potasio	RA	Mallinckrodt	7100 KCLZ
Heptanosulfonato de sodio	HPLC	Spectrum	PEO993
Heptanosulfonato de sodio *	RA	Sigma	29H5443
Acetonitrilo	RA	Mallinckrodt	0043 N42759
Ácido fosfórico	RA	J. T. Baker	M09C58
Ácido clorhídrico	RA	Merck	K2565861438
Hidróxido de sodio	RA	J. T. Baker	N15C53
Peróxido de hidrógeno	RA	Merck	K24864410820
Helio	4.6 cero	Praxair	2000085254
			2000085532
			2000096066
			2000106546

* Utilizado para la prueba de tolerancia

VI-1.2 Sustancias de referencia

- *Acetaminofén, sustancia de referencia secundaria.*
Previamente secado durante 18 horas sobre sílica gel.
- *Pseudoefedrina clorhidrato, sustancia de referencia secundaria.*
Previamente secada durante 3 horas a 105 °C.
- *Clorfeniramina maleato, sustancia de referencia secundaria.*
Previamente secada durante 3 horas a 105 °C.

VI-1.3 Formulación

Solución pediátrica de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato (3.2 g, 0.3 g, 0.02 g / 100 mL). No. de lote: D2000 091.
Fecha de fabricación: Abr 17, 2000.

VI-1.4 Placebo

Placebo de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato (Solución pediátrica de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato 3.2 g; 0.3 g; 0.02 g / 100 mL). No. de lote: D2000 092.
Fecha de fabricación: Abr 17, 2000.

VI-1.5 Material

- Equipo de filtración Millipore.
- Membranas de filtración Millipore hidrofílicas de 0.45 μm de tamaño de poro.
- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Pipeta automática Eppendorf de descarga múltiple.
- Puntas para pipetas Eppendorf de descarga múltiple de 5, 12.5, 25 y 50 mL.
- Matraces volumétricos 5, 10, 25, 50, 100 y 2000 mL.
- Vasos de precipitados de 50 y 100 mL.

VI-1.6 Equipo

Nombre	Marca	Modelo	Número de serie
Balanza analítica	Mettler	AE260	H97800
Potenciómetro	Beckman	PHI 45	0166489
Horno de vacío	Precisión	19	29AU-9
Horno programable	Fisher Scientific	838F	40400060
Baño de ultrasonido	Cole-palmer	8851	
Cámara de luz UV	-----	----	-----

VI-1.7 Equipo cromatográfico

Columna	Marca	Tipo	Número de serie
C18, 4.6 x 250 mm Partículas de 5 µm	Waters	Symmetry	T63101S28
C18, 3.9 x 150 mm Partículas de 5 µm	Waters	Symmetry	T90612R ^d T63111L16 ^d T73362R01 ^{d,v} T71571N*

^d Utilizadas durante el desarrollo del método analítico

^v Utilizada para la validación del método analítico

Pre columna	Marca	Tipo	Número de parte	Lote
C18, 3.9 x 22 mm Partículas de 5 µm	Waters	Symmetry	WATO54225	T82292 T90681*

Nombre	Marca	Modelo	Número de serie
Automuestreador	Waters	717 Plus 712D WISP	F9771P628M 71D-000257*
Detector de arreglo de fotodiodos	Waters	996 996	E97996502M G97996815M*
Controlador de sistema	Waters	600 600 E	F97600499M 6PLEPG257*
Bomba de gradiente	Waters	60 F 600 E	F9760F266M 600PF4661*
Programa			
Computadora	Dell	Millenium Versión 32	B3A23 B1NE4*

* Utilizado para la prueba de tolerancia

VI-2 Metodología para el desarrollo del método analítico

El método analítico se desarrolló a partir de una propuesta previa de un método para el análisis de muestras de disolución de tabletas de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato, en el cual se pretendía cuantificar a los tres principios activos.

El análisis para tabletas, mencionado anteriormente, proponía un método por cromatografía de líquidos de alta resolución por par iónico, con las siguientes condiciones cromatográficas: columna C18 de 3.9 x 150 mm y tamaño de partículas de 5 μm , 1 mL/min de velocidad de flujo de la fase móvil, 100 μL de volumen de inyección, detección a 260 nm para la pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato y 300 nm para el acetaminofén; y elución por gradiente con forma lineal de cambio de la composición de la fase móvil con respecto al tiempo, como a continuación se describe:

Gradiente inicial

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
16	75	25	Lineal
20	15	85	Lineal
25	15	85	Lineal

VI-2.1 Sistema cromatográfico

Se probaron las condiciones cromatográficas del método de análisis para tabletas antes descritas, analizando la solución pediátrica diluida en una mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85 para tener una concentración de 0.64 mg/mL de acetaminofén, 0.06 mg/mL de pseudoefedrina clorhidrato y 0.004 mg/mL de clorfeniramina maleato.

A partir de los resultados obtenidos se realizaron los cambios necesarios en las condiciones del gradiente inicial hasta llegar al gradiente que proporcionó la mejor resolución entre los tres principios activos y los excipientes.

VI-2.2 Método de cuantificación y volumen de inyección

El método de cuantificación y el volumen de inyección fueron seleccionados al realizar una evaluación de la linealidad del sistema, previa a la validación del método.

Se evaluó la linealidad del sistema con una curva de 5 niveles y 3 réplicas a partir de pesadas independientes en el intervalo de concentración de 0.384 a 0.896 mg/mL para acetaminofén, 0.0024 a 0.0056 mg/mL para clorfeniramina maleato y de 0.036 a 0.084 mg/mL para pseudoefedrina clorhidrato, correspondientes al 60 % y 140 % respectivamente, e inyectando al sistema los siguientes volúmenes de las muestras: 10, 15, 20 y 50 μ L.

Se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (x) a la concentración de acetaminofén o pseudoefedrina clorhidrato o clorfeniramina maleato y como variable dependiente (y) a la respuesta del compuesto de interés correspondiente, obteniendo:

- Ordenada al origen
- Coeficiente de determinación (r^2)
- Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen
- Coeficiente de variación (C.V.) del factor respuesta (respuesta/concentración).

El criterio de aceptación para la elección del volumen de inyección y el método de cuantificación fue el siguiente:

El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0.98, y el coeficiente de variación del factor respuesta debe ser menor o igual que 2.0 %.

Método de cuantificación puntual: el intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen incluye al cero.

Método de cuantificación por curva de calibración: el intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen no incluye al cero.

VI-2.3 Especificidad del método analítico

Para la evaluación de la especificidad de un método analítico es necesario demostrar experimentalmente que los excipientes y sustancias relacionadas al (los) principio(s) activo(s), como precursores de síntesis, impurezas o productos de degradación, no interfieran con la medición.

Las impurezas o productos de degradación en este caso, no están disponibles; por lo tanto, la especificidad se evaluó al degradar entre 10 y 30 % a las moléculas de interés en la formulación para obtener sus primeros y más importantes productos de degradación a través de reacciones controladas de degradación como hidrólisis ácida y básica, oxidación y fotólisis.

Para obtener la degradación de los compuestos de interés, se realizó una revisión bibliográfica sobre las diferentes condiciones de degradación para cada uno de estos; presentando así, una propuesta inicial en la que se pudieran degradar los tres principios activos.

Se probaron las condiciones de degradación propuestas, con muestras de placebo, blanco de reactivos y formulación; las cuales se analizaron con el sistema cromatográfico que se había propuesto hasta ese momento del desarrollo.

A partir de los resultados obtenidos se modificaron las condiciones de degradación probadas y se realizaron los cambios necesarios en las condiciones del gradiente del método en desarrollo, hasta llegar al gradiente que proporcionó la mejor resolución entre los tres principios activos, los excipientes y los productos de degradación obtenidos.

VI-3 Metodología para la validación del método analítico

VI-3.1 Especificidad

VI-3.1.1 Especificidad a excipientes

Se evaluó al procesar por triplicado muestras de placebo preparadas al 150 % de la concentración indicada en el método analítico propuesto y al analizarlas con éste mismo.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

Ninguno de los excipientes de la formulación debe presentar señal al tiempo de retención al cual eluyen el acetaminofén, la pseudoefedrina clorhidrato y la clorfeniramina maleato.

VI-3.1.2 Especificidad a productos de degradación

Se evaluó al someter muestras de placebo, blanco de reactivos y formulación procesadas según el método, a las condiciones de degradación ácida, básica, oxidativa y con luz ultravioleta definidas durante el desarrollo del método analítico.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

Los productos de degradación no deben presentar señales que interfieran con los compuestos de interés.

En un análisis espectral, las señales cromatográficas de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato deben ser puras.

VI-3.2 Linealidad del sistema

Se evaluó al determinar la relación que existe entre la concentración de acetaminofén o pseudoefedrina clorhidrato o clorfeniramina maleato (x) y su respuesta, expresada como el área bajo la curva (y); al preparar una curva con 5 niveles y 3 réplicas por nivel a partir de pesadas independientes y en el intervalo de concentración de 0.384 a 0.896 mg/mL para acetaminofén, 0.0024 a 0.0056 mg/mL para clorfeniramina maleato y de 0.036 a 0.084 mg/mL para pseudoefedrina clorhidrato, correspondientes al 60 % y 140 % respectivamente, establecido en el método analítico.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados para cada uno de los compuestos de interés, obteniéndose:

- Ordenada al origen y pendiente
- Coeficiente de determinación (r^2)
- Gráfica
- Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen
- Número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.) del factor respuesta (respuesta/concentración).

El criterio de aceptación fue el siguiente:

El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0.98, y el coeficiente de variación del factor respuesta debe ser menor o igual que 2.0 %.

VI-3.3 Precisión del sistema

Se evaluó al inyectar por sextuplicado al sistema cromatográfico una solución de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato a una concentración igual al 100 % establecido en el método analítico.

Se calculó el promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.) de la respuesta de las seis inyecciones para cada uno de los compuestos de interés.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

El coeficiente de variación de la respuesta de cada uno de los compuestos de interés debe ser menor o igual que 1.5 %.

VI-3.4 Linealidad del método

Se evaluó al determinar la relación que existe entre los mg adicionados de placebos cargados (x) y los mg recuperados (y) de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato; preparando una curva con 3 niveles y 3 réplicas por nivel a partir de pesadas independientes y en el intervalo correspondiente al 60 % y 140 % establecido en el método analítico.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para cada uno de los compuestos de interés obteniéndose:

- Ordenada al origen y pendiente
- Coeficiente de determinación (r^2)
- Ecuación de la recta
- Gráfica
- Porcentaje recuperado, número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.)
- Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen y la pendiente.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

El coeficiente de determinación debe ser mayor que 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente a uno. El promedio del porcentaje recuperado para cada sustancia de interés, debe encontrarse entre 98.0 y 102.0 % y el coeficiente de variación debe ser menor o igual que 2.0 %.

VI-3.5 Exactitud del método

Se evaluó al preparar, a partir de pesadas independientes, 6 réplicas de una muestra de placebo cargado al 100 % establecido en el método analítico.

Se calculó el porcentaje recuperado, número de datos (n) y promedio del porcentaje recuperado; para cada uno de los compuestos de interés.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

El promedio del porcentaje recuperado debe encontrarse entre 98.0 y 102.0 %.

VI-3.6 Precisión del método

VI-3.6.1 Repetibilidad

Se evaluó al preparar, a partir de pesadas independientes, 6 réplicas de una muestra de placebo cargado al 100 % establecido en el método analítico.

Se calculó el porcentaje recuperado, número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación del porcentaje recuperado de las seis réplicas analizadas.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

El coeficiente de variación debe ser menor o igual que 2.0 %.

VI-3.6.2 Precisión intermedia

Se evaluó al analizar por triplicado, de acuerdo con el método, una muestra homogénea del producto durante dos días, por dos analistas.

Para cada día de análisis y para los resultados globales, se calculó el porcentaje cuantificado, promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.) para cada uno de los compuestos de interés.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

El coeficiente de variación del porcentaje cuantificado, para cada día de análisis y el global no debe ser mayor que 2.0 %.

VI-3.7 Intervalo

Se determinó a partir de la linealidad, exactitud y precisión del método, reportando el intervalo de trabajo al cual se demostró que se cumple con los criterios de linealidad, exactitud y precisión.

VI-3.8 Robustez

VI-3.8.1 Estabilidad de la muestra

Se evaluó al cuantificar con respecto a una curva de calibración preparada el mismo día de análisis, 3 réplicas de una muestra homogénea del producto procesadas según el método analítico, después de su almacenamiento durante 24, 48 y 72 horas a temperatura ambiente con ciclos normales de luz y oscuridad.

Para cada día de análisis se calculó el porcentaje cuantificado y se obtuvo el promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.) para cada uno de los compuestos de interés. Así mismo, se calculó la diferencia relativa entre el promedio del porcentaje cuantificado en el primer día de análisis con respecto al promedio del porcentaje cuantificado a las 24, 48 y 72 horas.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

La diferencia relativa de los promedios del porcentaje cuantificado a las 24, 48 y 72 horas respecto al tiempo cero, no debe ser mayor que 2.0 %.

VI-3.8.2 Tolerancia del sistema

Se evaluó al procesar 3 muestras de la formulación según el método propuesto y al analizarlas en cada una de las condiciones indicadas en la *Tabla 2* (recursos materiales: punto *VI-1*), junto con una réplica de las muestras de placebo preparadas al 150 % y de las muestras de formulación degradadas por oxidación, hidrólisis ácida y básica.

En cada una de las condiciones, se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado de las 3 muestras, así como, los parámetros cromatográficos para los compuestos de interés.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

La diferencia relativa del promedio del porcentaje cuantificado obtenido de las tres réplicas de la muestra, analizadas en cada una de las condiciones, respecto al promedio del porcentaje cuantificado de las tres réplicas de la muestra analizadas con las condiciones iniciales, no debe ser mayor que 2.0 %.

Las muestras de placebo y las muestras de formulación degradadas por oxidación, hidrólisis ácida y básica, no deben presentar señal alguna que interfiriera con los compuestos de interés.

En el análisis espectral, las señales cromatográficas de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato deben ser puras.

TABLA 2
Condiciones para la evaluación de la tolerancia del sistema

Condición	Cambio efectuado en el sistema cromatográfico
Inicial	Ninguno
1	Columna del mismo tipo, pero de diferente eficiencia
2	Equipo cromatográfico
3	Calidad del heptanosulfonato de sodio

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VII-1 Desarrollo del método analítico

VII-1.1 Sistema cromatográfico

El análisis para tabletas, con el cual se inició el desarrollo del método analítico, proponía un método por cromatografía de líquidos de alta resolución por par iónico, con las siguientes condiciones cromatográficas: columna C18 de 3.9 x 150 mm y tamaño de partículas de 5 μm , 1 mL/min de velocidad de flujo de la fase móvil, 100 μL de volumen de inyección, detección a 260 nm para la pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato y 300 nm para el acetaminofén; y elución por gradiente con forma lineal de cambio de la composición de la fase móvil con respecto al tiempo, como a continuación se describe:

Gradiente inicial

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
16	75	25	Lineal
20	15	85	Lineal
25	15	85	Lineal

El primer paso a seguir fue probar las condiciones cromatográficas antes descritas en la solución pediátrica, con el fin de saber si los tres activos se resolvían de los excipientes.

Se realizó una dilución de la muestra con una mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85 para tener una concentración de 0.64 mg/mL de acetaminofén, 0.06 mg/mL de pseudoefedrina clorhidrato y 0.004 mg/mL de clorfeniramina maleato.

Con estas condiciones cromatográficas, el acetaminofén y la pseudoefedrina clorhidrato sí se resolvieron, pero se observó que la clorfeniramina maleato no se resolvía de excipientes con mayor y menor tiempo de retención del de ésta. Por lo anterior, se decidió cambiar la columna por una con las mismas características pero de mayor longitud (4.6 x 250 mm), para incrementar la eficiencia en la separación de los compuestos de interés. Se inyectaron solamente 50 µL para disminuir la respuesta del acetaminofén y evitar la saturación del detector ya que este compuesto presenta una elevada concentración en la muestra.

Con este cambio, se mejoró la resolución de los picos de interés, pero la clorfeniramina maleato siguió sin estar resuelta de los excipientes de menor tiempo de retención al de ésta. Como era de esperarse, los tiempos de retención también cambiaron, y al parecer el de la clorfeniramina coincidía con el momento en el que se llevaba a cabo el cambio en la proporción de 75:25 a 15:85 de la mezcla acetonitrilo/solución amortiguadora de la fase móvil. Por lo que, se procedió a probar diferentes tiempos y formas (lineal, cóncava y convexa) en el gradiente, como a continuación se describe:

Gradiente 1

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
12	75	25	Lineal
17	15	85	Lineal
25	15	85	Lineal

Gradiente 2

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
17	75	25	Lineal
21	15	85	Lineal
29	15	85	Lineal

Gradiente 3

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
15	75	25	Lineal
19	15	85	Lineal
27	15	85	Lineal

Gradiente 4

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
20	75	25	Lineal
24	15	85	Lineal
32	15	85	Lineal

Gradiente 5

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del Gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
25	75	25	Lineal
29	15	85	Lineal
37	15	85	Lineal

Gradiente 6

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del Gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
15	75	25	Convexa
19	15	85	Lineal
27	15	85	Lineal

Gradiente 7

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:		Forma del Gradiente
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora	
0	15	85	-
15	75	25	Cóncava
19	15	85	Lineal
27	15	85	Lineal

Con la forma cóncava y convexa del gradiente, no se resolvieron los compuestos de interés por lo que, la forma lineal, resultó ser la más adecuada junto con los tiempos del *Gradiente 5*; el cual, de los 5 gradientes probados, presentó una mejor resolución (*Figura 6*) de los compuestos de interés, sin embargo, la clorfeniramina maleato no se resolvió por completo de uno de los excipiente de la formulación.

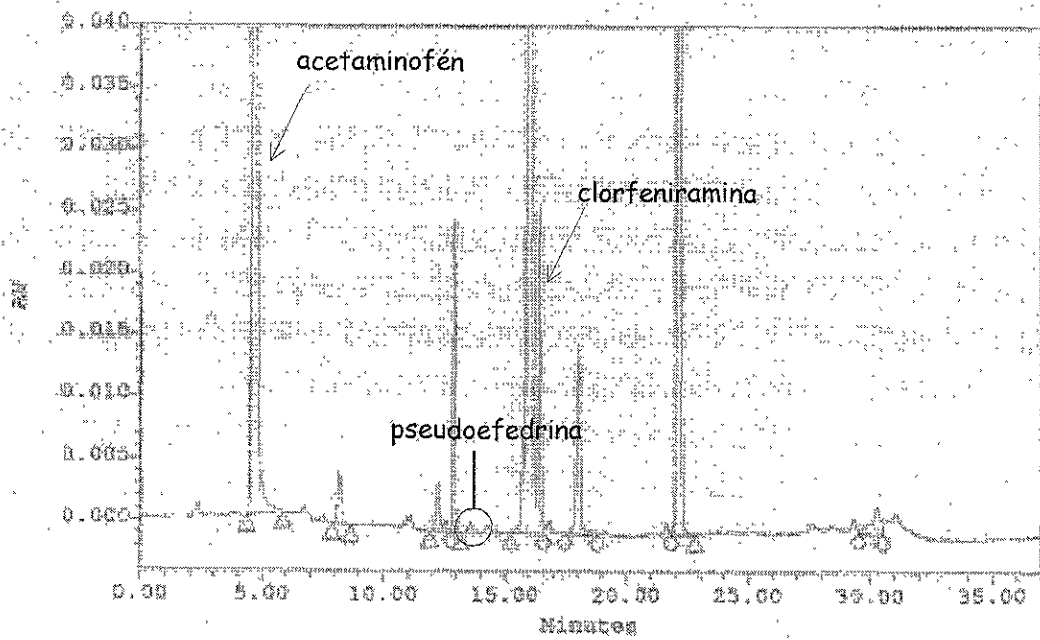


FIGURA 6

Gradiente 5 - Formulación

Posteriormente, para mejorar la resolución, se probaron los siguientes gradientes, todos, con forma lineal a partir de este momento(modificaciones del *Gradiente 5*):

Gradiente 8

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
30	70	30
34	15	85
42	15	85

Gradiente 9

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
35	65	35
39	15	85
47	15	85

Gradiente 10

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
45	60	40
49	15	85
57	15	85

Obteniéndose que, los gradientes 8 (Figura 7) y 9 (Figura 8) mejoraban la resolución de los tres compuestos de interés; pero con el 8, la pseudoefedrina clorhidrato no se resolvía de uno de los excipientes; y con el 9, la clorfeniramina maleato no se resolvía de otro excipiente.

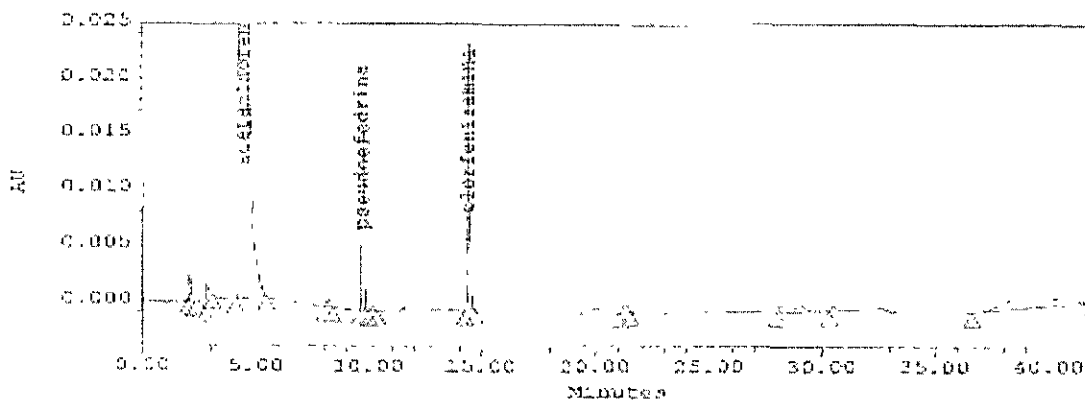


FIGURA 7-1
Gradiente 8 - Solución de referencia

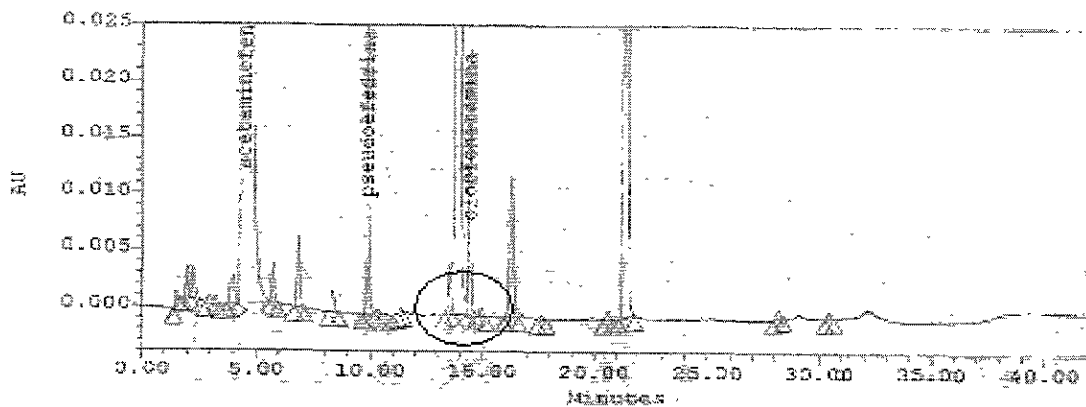


FIGURA 7-2
Gradiente 8 - Formulación

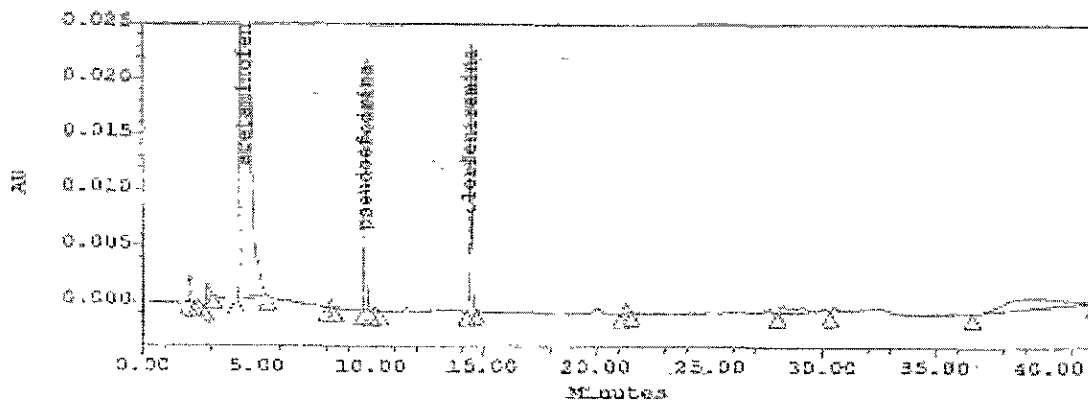


FIGURA 8-1
Gradiente 9 - Solución de referencia

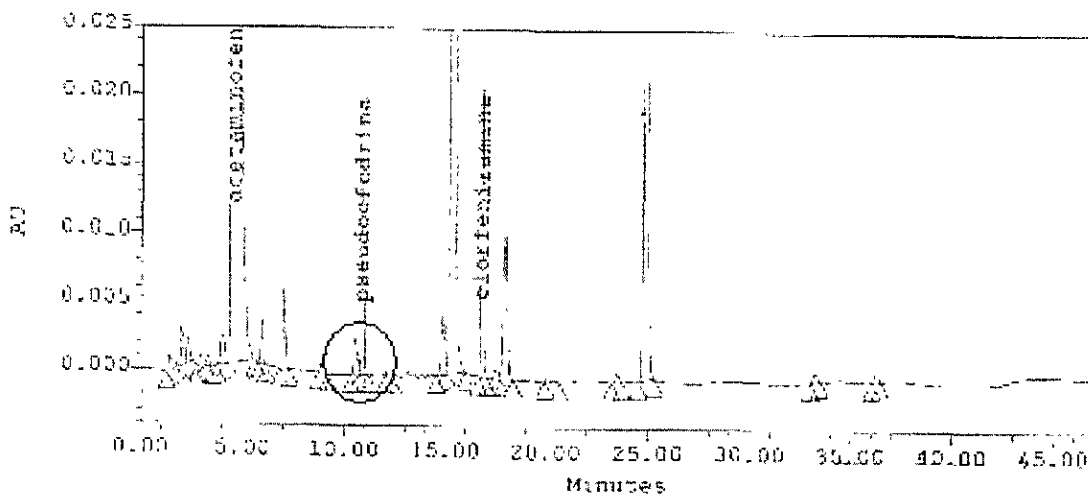


FIGURA 8-2
Gradiente 9 - Formulación

A partir de los resultados anteriores, se propuso un gradiente intermedio (*Gradiente 11*):

Gradiente 11

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
25	30	70
35	75	25
39	15	85
47	15	85

El cual (*Figura 9*), dio buenos resultados para resolver los tres compuestos de interés; por lo que, se procedió a optimizar el método de análisis con dicho gradiente.

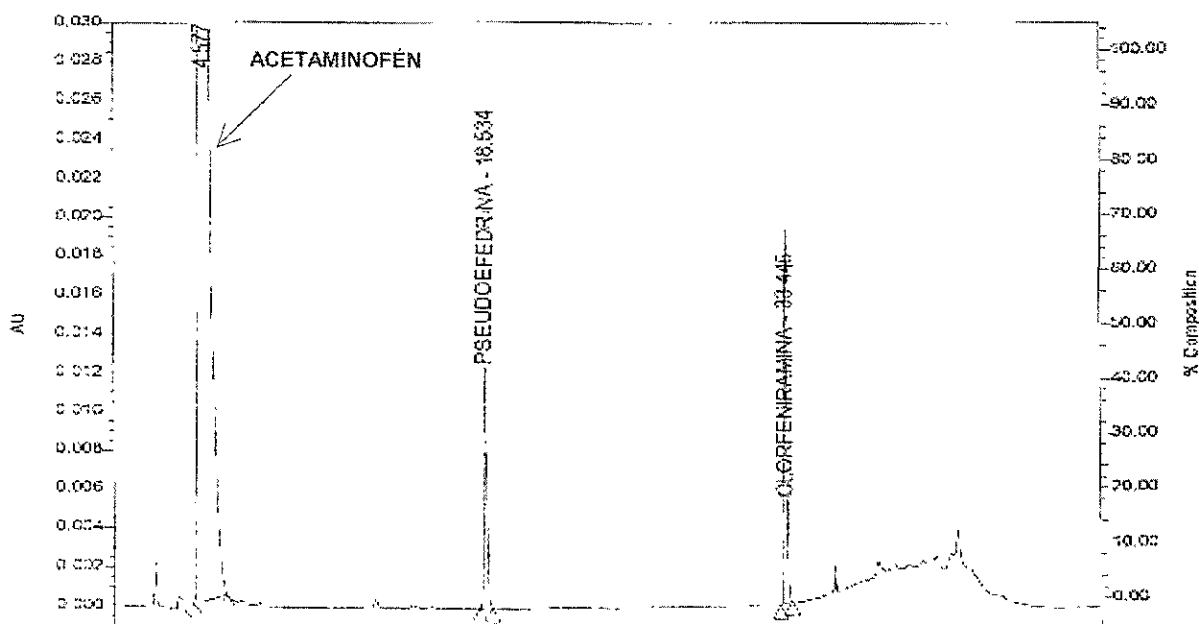


FIGURA 9-1
Gradiente 11 - Solución de referencia

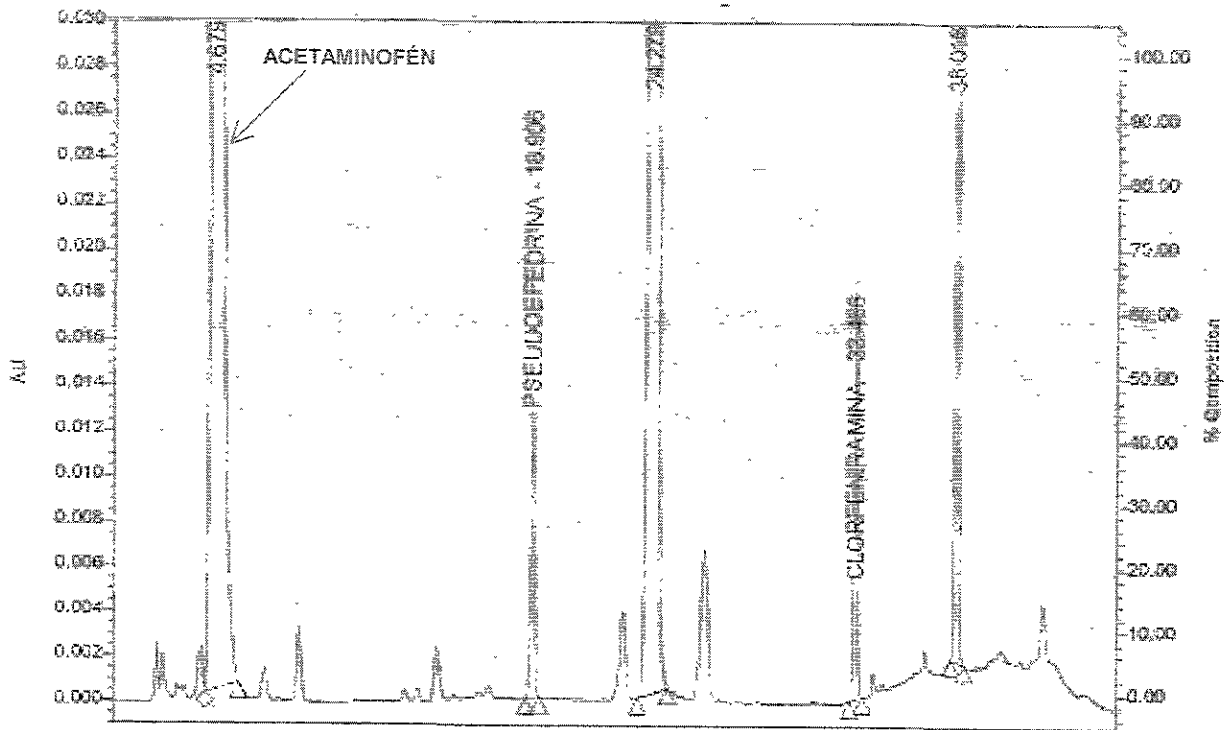


FIGURA 9-2
Gradiente 11 - Formulación

Como primer paso, para disminuir el tiempo de corrida, se cambió la columna que se estaba utilizando por una de menor longitud (3.9 x 150 mm): *Figuras 10-1 a 10-4*.

Debido a la gran diferencia de respuestas entre el acetaminofén y los otros dos compuestos de interés, los cromatogramas, a partir de este momento, se presentaron a dos escalas; una que muestra el pico completo del acetaminofén y otra que muestra los picos completos de pseudoefedrina clorhidrato y de clorfeniramina maleato.

En las *Figuras 10-1 y 10-2* se muestran respectivamente la solución de referencia y la de la formulación del acetaminofén.

En las *Figuras 10-3 y 10-4* se muestran respectivamente la solución de referencia y la de la formulación de la pseudoefedrina clorhidrato y de la clorfeniramina maleato; a esta escala el acetaminofén presenta interferencias que no son significativas como se puede ver en las *Figuras 10-1 y 10-2*.

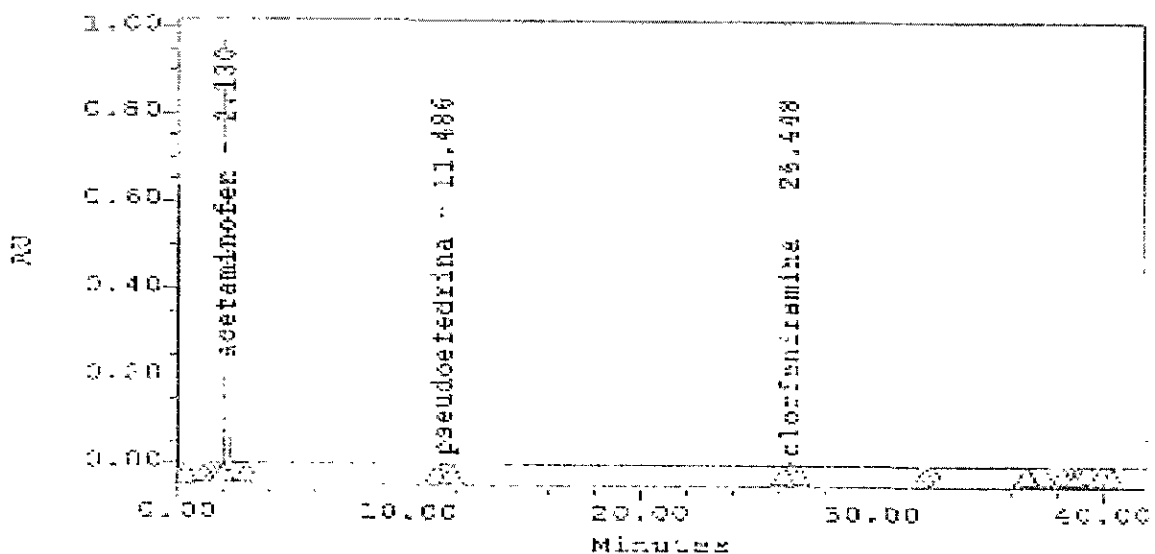


FIGURA 10-1

Gradiente 11, columna de 3.9 x 150 mm.
Acetaminofén, solución de referencia

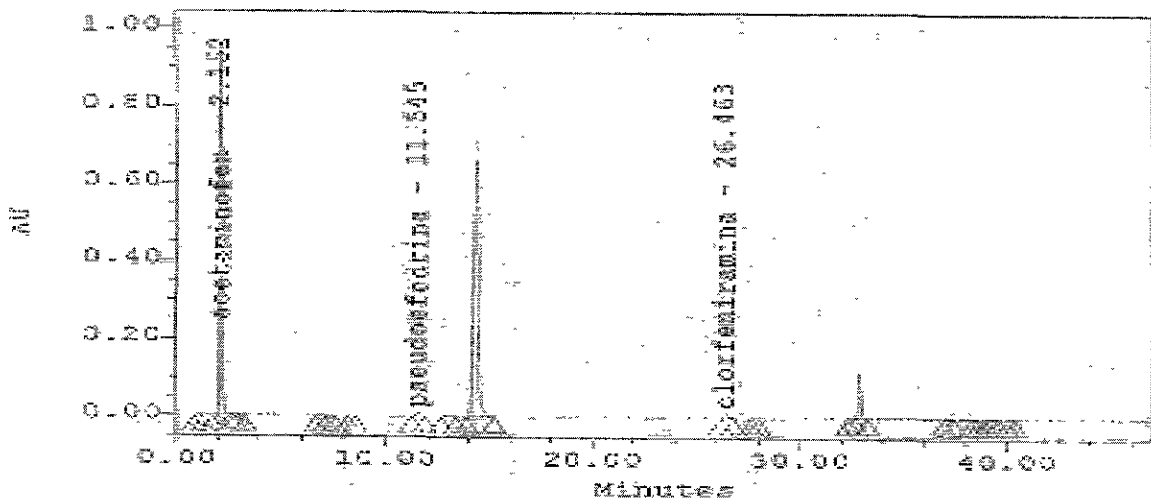


FIGURA 10-2

Gradiente 11, columna de 3.9 x 150 mm.
Acetaminofén, formulación

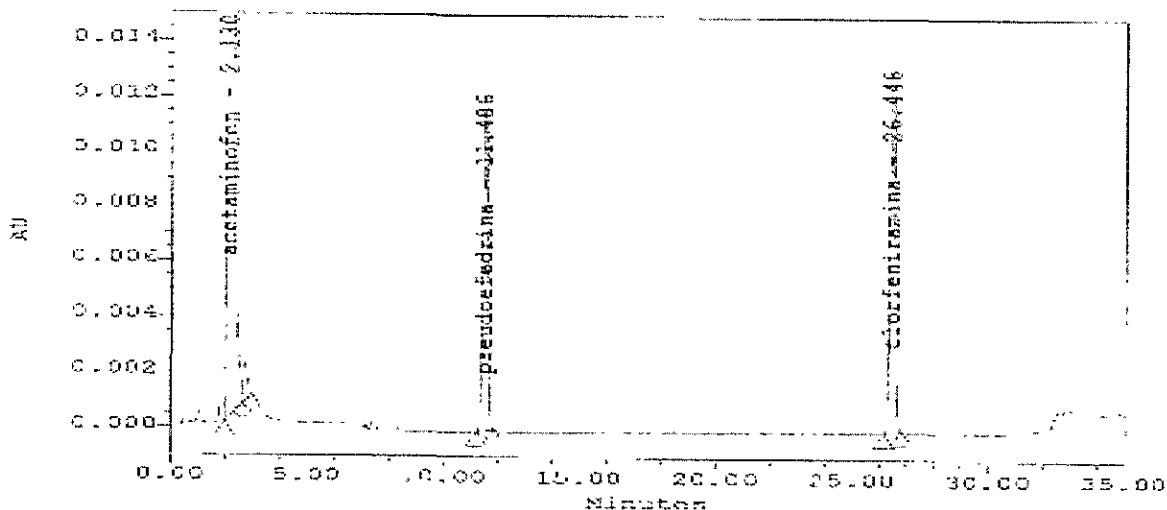


FIGURA 10-3

Gradiente 11, columna de 3.9 x 150 mm.
Pseudoefedrina y clorfeniramina, solución de referencia

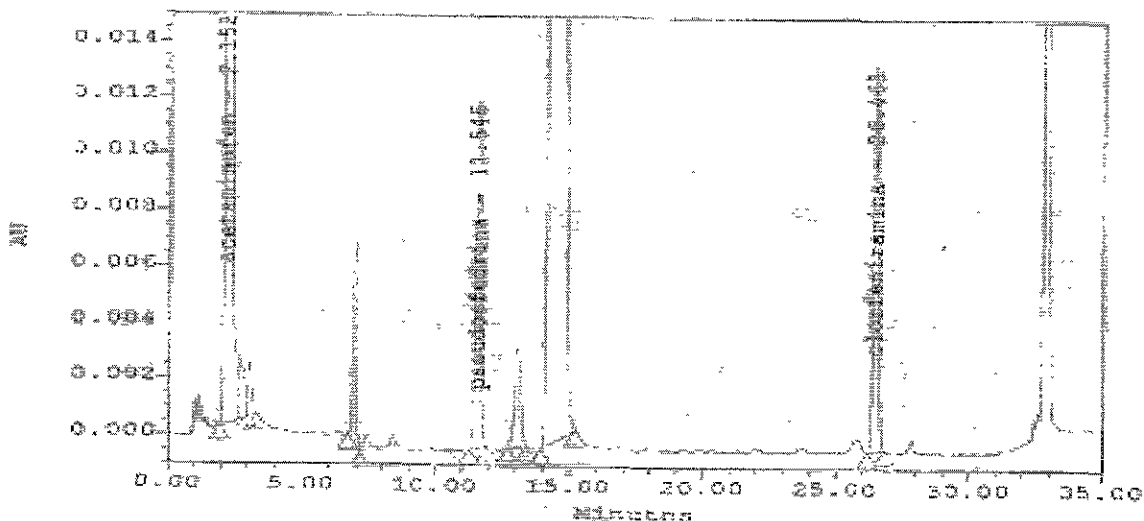


FIGURA 10-4

**Gradiente 11, columna de 3.9 x 150 mm.
Pseudoefedrina y clorfeniramina, formulación**

Como se muestra en los cromatogramas anteriores, se redujeron los tiempos de retención de los compuestos de interés, lo que permitió posteriormente disminuir el tiempo de corrida.

Al haber realizado el cambio de columna, se presentó un excipiente con un tiempo de retención muy cercano al de la clorfeniramina maleato, por lo que, para obtener una resolución mayor entre estos, se propuso el siguiente gradiente:

Gradiente 12

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
25	30	70
37	75	25
41	15	85
49	15	85

Con este último gradiente (*Gradiente 12*), las señales de la pseudoefedrina clorhidrato y la clorfeniramina maleato se obtuvieron bien resueltas (*Figura 11*), sin embargo el acetaminofén presentó un tiempo de retención muy cercano al del frente del disolvente, lo que ocasionó desestabilización de la línea base durante los primeros minutos.

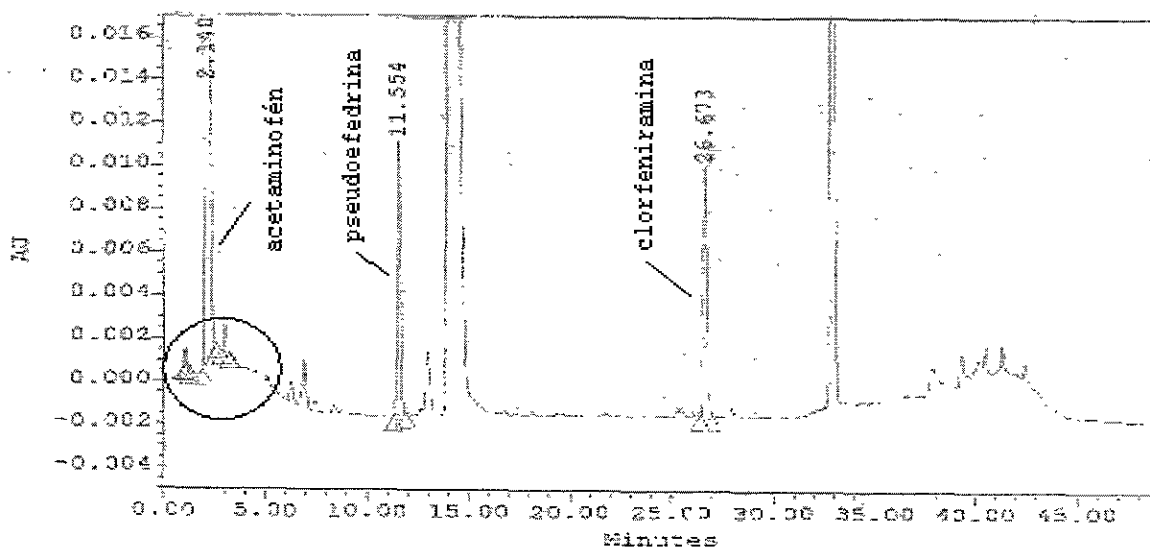


FIGURA 11
Gradiente 12 - Formulación

Se propuso la siguiente modificación al gradiente 12 (*Gradiente 13*) con el fin de estabilizar la línea base antes de eluir al acetaminofén, y para acortar el tiempo de corrida como ya se proponía anteriormente:

Gradiente 13

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
1	15	85
23	30	70
27	75	25
29	15	85
32	15	85

Con el *Gradiente 13*, después de la 1ª inyección de prueba, los compuestos de interés, no se retuvieron o se retenían a diferentes tiempos entre cada inyección, lo que indicó que, no se estaba dejando suficiente tiempo al final del gradiente para que se llevara a cabo el equilibrio en la columna con la proporción inicial 15: 85 de acetonitrilo / solución amortiguadora por lo que, se dieron 3 minutos más al final del *Gradiente 13*:

Gradiente 14

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
1	15	85
23	30	70
27	75	25
29	15	85
35	15	85

Como se muestra en las *Figuras 12-1 a la 12-3*, con el *Gradiente 14* se resolvieron bien los tres picos de interés, se dio el tiempo suficiente para estabilizar al sistema con la proporción inicial entre cada inyección de la solución de referencia y de la formulación, y se mejoró la estabilización de la línea base en los primeros minutos de corrida.

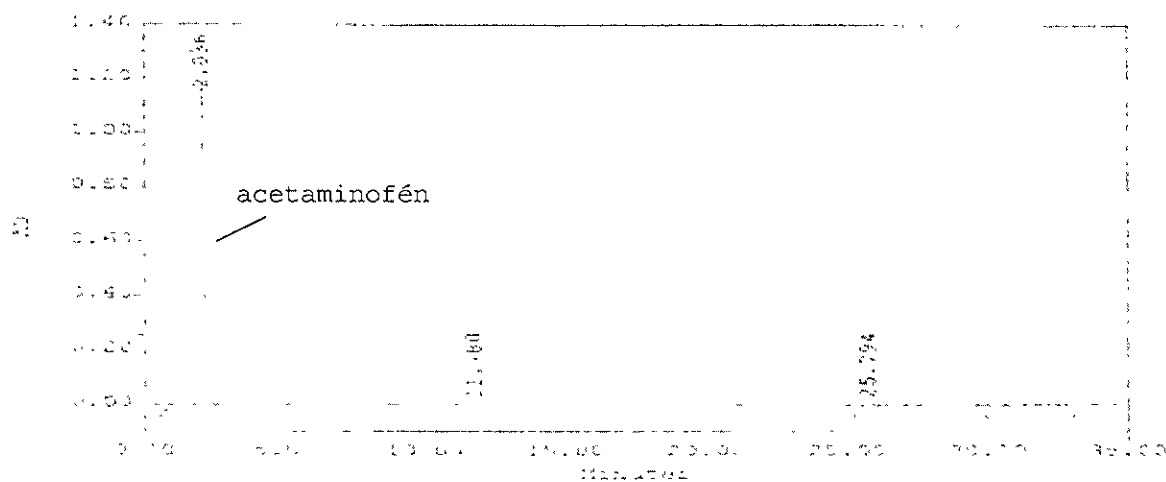


FIGURA 12-1
Gradiente 14 - Acetaminofén

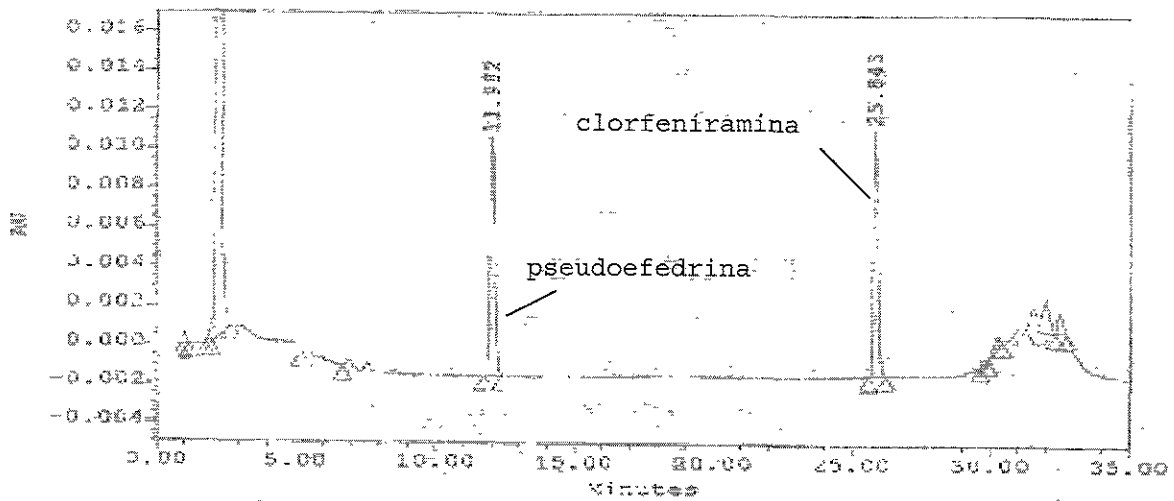


FIGURA 12-2

Gradiente 14

Pseudoefedrina y clorfeniramina, solución de referencia

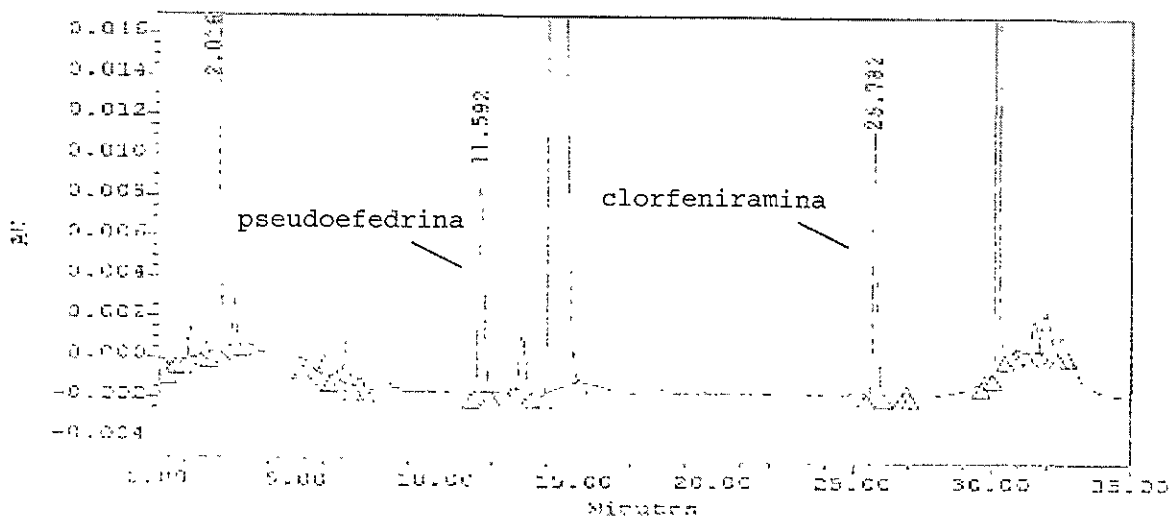


FIGURA 12-3

Gradiente 14

Pseudoefedrina y clorfeniramina, formulación

Una vez probada la reproducibilidad de los tiempos de retención y de la resolución de los compuestos de interés entre inyecciones consecutivas e intercaladas de la solución de referencia y de la formulación, se concluyó que el *Gradiente 14* era el más conveniente para el método en desarrollo.

Durante el desarrollo del método de análisis se observó que el acetaminofén presentaba una respuesta muy grande en comparación con los otros dos activos; por lo que se dejó la longitud de onda de 300 nm. para tener una menor absorbancia del acetaminofén y no saturar el sistema; y la de 260 nm. para obtener una mayor absorbancia de los otros dos activos.

Hasta esta etapa del desarrollo, el método de análisis era el siguiente:

Condiciones cromatográficas.-

Columna: C18 de 3.9 x 150 mm y tamaño de partículas de 5 μm

Velocidad de flujo de la fase móvil: 1 mL/min

Volumen de inyección: 50 μL

Detección a 260 y 300 nm

Gradiente con forma lineal de cambio de la composición de la fase móvil con respecto al tiempo:

Gradiente 14

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
1	15	85
23	30	70
27	75	25
29	15	85
35	15	85

Preparación de la muestra.-

Transferir una alícuota de 1.0 mL de la solución pediátrica a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85 para tener una concentración de 0.64 mg/mL de acetaminofén, 0.06 mg/mL de pseudoefedrina clorhidrato y 0.004 mg/mL de clorfeniramina maleato.

VII-1.2 Método de cuantificación y volumen de inyección

El método de cuantificación y el volumen de inyección, se seleccionaron al realizar una evaluación de la linealidad del sistema, previa a la validación del método, de la cual, se obtuvieron los siguientes resultados:

Para la clorfeniramina maleato y para la pseudoefedrina clorhidrato, el coeficiente de determinación (r^2) fue mayor que 0.98, el coeficiente de variación del factor respuesta (área bajo la curva / concentración) fue menor que 2 %, el intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen incluyó al cero para la clorfeniramina maleato, y no así para la pseudoefedrina clorhidrato que, sin embargo, presentó un comportamiento lineal; lo anterior justificó el uso de una curva de calibración para la cuantificación de la pseudoefedrina clorhidrato.

Para el acetaminofén, el intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen tampoco incluyó al cero y el coeficiente de variación del factor respuesta fue mayor que 2 % por lo que se descartó un comportamiento lineal, atribuido a la saturación del sistema por su alta concentración en las muestras, a diferencia de los otros dos activos.

Así, para no saturar el sistema con la alta concentración de acetaminofén y al mismo tiempo tener concentraciones lo suficientemente grandes de pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato que proporcionaran la sensibilidad necesaria para la cuantificación de éstas, se probaron menores volúmenes de inyección al aplicado anteriormente (10, 15 y 20 μL); y se evaluó la linealidad del sistema con cada uno de ellos.

Al evaluar la linealidad del sistema con estos volúmenes de inyección se observó que, para los tres compuestos de interés, 15 μL fue el volumen más adecuado, debido a que con éste se presentó un comportamiento lineal para los tres compuestos de interés, con un coeficiente de determinación (r^2) mayor que 0.98, reflejado en el coeficiente de variación del factor respuesta menor que 2 %.

El intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen, no incluyó al cero solamente para la pseudoefedrina clorhidrato lo que confirmaba que, para su cuantificación se debía utilizar una curva de calibración.

Por lo anterior, se determinó que, la cuantificación de los tres compuestos de interés se realizaría por medio de la misma curva de calibración que se debía utilizar para la cuantificación de la pseudoefedrina clorhidrato; aun cuando el acetaminofén y la clorfeniramina maleato se pudieran cuantificar de manera puntual.

También se observó que debido a las concentraciones tan bajas de pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato (0.06 mg/mL y 0.004 mg/mL respectivamente) en la muestra y con el volumen de inyección que resultó ser el más adecuado (15 μ L), el nivel de ruido en la línea base provocado por el gradiente, afectaba considerablemente la medición del área bajo la curva de los picos de estos dos compuestos de interés; por lo que, para obtener resultados exactos y precisos, fue necesario asegurar la integración utilizando el nivel de ruido apropiado para cada compuesto de interés.

VII-1.3 Especificidad del método analítico

Para obtener la degradación de los compuestos de interés, se realizó una revisión bibliográfica sobre las diferentes condiciones de degradación para cada uno de los compuestos de interés; presentando así, la siguiente propuesta (Tabla 3) con la que se pretendió degradar a los tres principios activos:

TABLA 3
Condiciones de degradación - propuesta inicial

Reacción de degradación	Hidrólisis ácida	Hidrólisis básica	Oxidación	Fotólisis
Reactivo	HCl 0.5 N	NaOH 1.0 N	H ₂ O ₂ 30%	Luz UV
Volumen adicionado	1 mL	1 mL	1 mL	-----
Temperatura	70 °C	70 °C	70 °C	-----
Tiempo de degradación	20 h	20 h	20 h	96 h

Al analizar las muestras de las degradaciones que no contenían a la clorfeniramina maleato (blanco de reactivos, y placebo), se observó que, en el tiempo de retención de ésta, aparecía una pequeña respuesta que hacía pensar que las muestras estaban contaminadas con clorfeniramina maleato.

Después de algunos experimentos, se llegó a la conclusión de que dicha respuesta era causada por el gradiente al haber cambiado de bomba, y no por la presencia de clorfeniramina maleato. Por lo tanto se decidió realizar modificaciones en el *Gradiente 14* para estabilizar la línea base y que la pequeña respuesta (pico fantasma) no interfiriera en la especificidad del método para clorfeniramina maleato al cambiar de bomba de gradiente.

Se probaron paulatinamente varios gradientes hasta llegar al *Gradiente 15* con el cual, ya no se presentaba el pico fantasma que interfería con la cuantificación de la clorfeniramina maleato (*Figuras 13-1 y 13-2*):

Gradiente 15

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
1	15	85
20	26	74
23	30	70
24	75	25
25	15	85
28	15	85

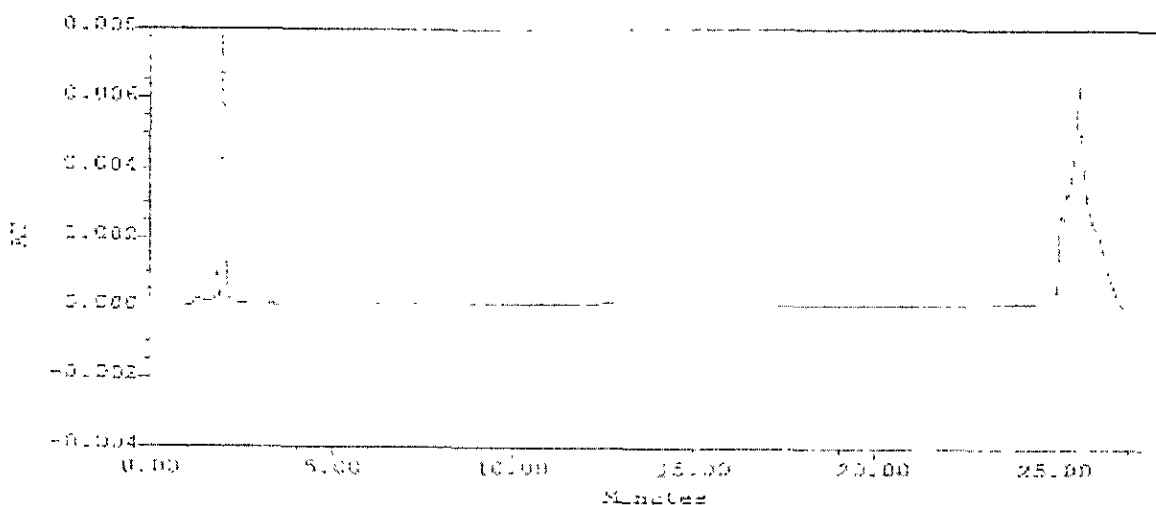


FIGURA 13-1
Gradiente 15 - Blanco de reactivos

El método de análisis quedaba finalmente de la siguiente manera:

- Condiciones cromatográficas.-

Columna: C18 de 3.9 x 150 mm y tamaño de partículas de 5 μm

Velocidad de flujo de la fase móvil: 1 mL/min

Volumen de inyección: 15 μL

Detección a 260 y 300 nm

Gradiente con forma lineal de cambio de la composición de la fase móvil con respecto al tiempo:

Gradiente 16

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
1	15	85
20	26	74
23	30	70
24	75	25
25	15	85
35	15	85

- Preparación de la muestra.-

Transferir una alícuota de 1.0 mL de la solución pediátrica a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85 para tener una concentración de 0.64 mg/mL de acetaminofén, 0.06 mg/mL de pseudoefedrina clorhidrato y 0.004 mg/mL de clorfeniramina maleato.

- Cuantificación de los principios activos por curva de calibración.

Una vez establecido el gradiente más adecuado para el método analítico, se probaron nuevamente las condiciones de degradación propuestas inicialmente (*Tabla 3*), con las cuales, dependiendo del principio activo, se obtuvieron degradaciones mayores al 30 % o no hubo degradación de alguno de los compuestos de interés.

Por lo anterior, para obtener la degradación de aproximadamente un 20 % de los compuestos de interés que se degradaban en las muestras que los contenían, se propusieron finalmente las siguientes condiciones de degradación:

TABLA 4
Condiciones de degradación

Muestras	Hidrólisis ácida HCl 0.5 N	Hidrólisis básica NaOH 1.0 N	Oxidación H ₂ O ₂ 30%	Fotólisis Luz UV
-Formulación	1 mL	2 mL	1 mL	-----
-Blanco de reactivos	70 °C	70 °C	70 °C	-----
-Placebo	4 h	20 h	4 h	400 h

VII-1.4 Observaciones durante el desarrollo

- A) Se encontró que el método era sensible al grado de pureza del heptanosulfonato de sodio, el cual era uno de los reactivos empleados para la solución amortiguadora de la fase móvil, ya que cuando se utilizaba este reactivo con grado de pureza menor al HPLC (grado reactivo), se observaba mayor ruido en la línea base de los cromatogramas a causa del aumento de impurezas durante los análisis, afectando así, la integración de la pseudoefedrina clorhidrato y la clorfeniramina maleato.
- B) También se observó que debido a las concentraciones tan bajas de pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato (0.06 mg/mL y 0.004 mg/mL respectivamente) en la muestra y con el volumen de inyección tan pequeño (15 μ L), el nivel de ruido en la línea base, afectaba considerablemente la medición del área bajo la curva de los picos de estos dos compuestos de interés; por lo que, para obtener resultados exactos y precisos, era necesario asegurar la integración utilizando el nivel de ruido apropiado para cada compuesto de interés.
- C) Antes de empezar un análisis en un mismo equipo, se necesitaban de cuando menos 8 inyecciones de la solución de referencia o de la formulación para el acondicionamiento del sistema cromatográfico. Al cambiar de equipo, era necesario lavar y acondicionar el sistema por lo menos durante 12 horas.
- D) Cabe señalar, por otra parte, que durante los ensayos de la prueba de linealidad del sistema se cambió algunas veces de columna debido a la pérdida progresiva de su eficiencia causada por la agresividad de las sales de la fase móvil, por lo que, para prolongar la duración de la eficiencia de la columna se decidió adicionar una precolumna al equipo cromatográfico.

VII-1.5 Método de análisis desarrollado

Propuesta final del método de análisis para cuantificar acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato en una solución pediátrica como producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad:

- Condiciones cromatográficas:

Columna: C18 de 3.9 x 150 mm y tamaño de partículas de 5 μm

Precolumna: C18 de 3.9 x 22 mm y tamaño de partículas de 5 μm

Velocidad de flujo de la fase móvil: 1 mL/min

Volumen de inyección: 15 μL

Detección a 260 y 300 nm

Gradiente con forma lineal de cambio de la composición de la fase móvil con respecto al tiempo:

Gradiente 16

Tiempo (min)	Proporción de la fase móvil:	
	Acetonitrilo	Solución amortiguadora
0	15	85
1	15	85
20	26	74
23	30	70
24	75	25
25	15	85
35	15	85

- Acondicionamiento del sistema cromatográfico con al menos 8 inyecciones de la solución de referencia.
- Cuantificación de los principios activos por curva de calibración.
- Preparación de la muestra.-

Transferir una alícuota de 0.5 mL de la solución pediátrica a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con una mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85 para tener una concentración de 0.64 mg/mL de acetaminofén, 0.06 mg/mL de pseudoefedrina clorhidrato y 0.004 mg/mL de clorfeniramina maleato.

- Preparación de la curva de calibración.-

Solución concentrada de pseudoefedrina clorhidrato (PS-CC):

Transferir aproximadamente 150 mg de pseudoefedrina clorhidrato pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con la mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85. Concentración aproximada de pseudoefedrina clorhidrato 15 mg/mL

Solución concentrada de clorfeniramina maleato (CL-CC):

Transferir aproximadamente 100 mg de clorfeniramina maleato, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con la mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85. Concentración aproximada de clorfeniramina maleato 1 mg/mL.

Solución Stock de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato (CC):

Transferir aproximadamente 320 mg de acetaminofén, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 15 mL de acetonitrilo y mezclar. Colocar en baño de ultrasonido durante 30 min. Adicionar 20 mL de solución amortiguadora y mezclar.

Transferir una alícuota de 2 mL de las soluciones PS-CC y CL-CC y llevar a volumen con solución amortiguadora.

Concentración aproximada de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato: 6.4 mg/mL, 0.6 mg/mL y 0.04 mg/mL.

Curva de calibración:

Transferir por separado a matraces volumétricos de 50 mL, los volúmenes de CC que se indican en la tabla siguiente, llevar a volumen con la mezcla de acetonitrilo/solución amortiguadora en proporción 15:85 e inyectar al sistema cromatográfico:

Curva de calibración

Nivel (%)	Volumen de solución-CC (mL)	Concentración aproximada de		
		pseudoefedrina clorhidrato (mg/mL)	clorfeniramina maleato (mg/mL)	acetaminofén (mg/mL)
60	3	0.036	0.0024	0.384
100	5	0.060	0.0040	0.640
140	7	0.084	0.0056	0.896

VII-2 Validación del método analítico

VII-2.1 Especificidad

VII-2.1.1 Especificidad a excipientes

De la *Figura 14-1* a la *14-4* se muestran los cromatogramas de la formulación y del placebo, en donde se puede apreciar que ninguno de los excipientes presentes en la formulación presenta absorción en el área a la cual eluyen el acetaminofén, la pseudoefedrina clorhidrato y la clorfeniramina maleato.

El método es específico en presencia de excipientes.

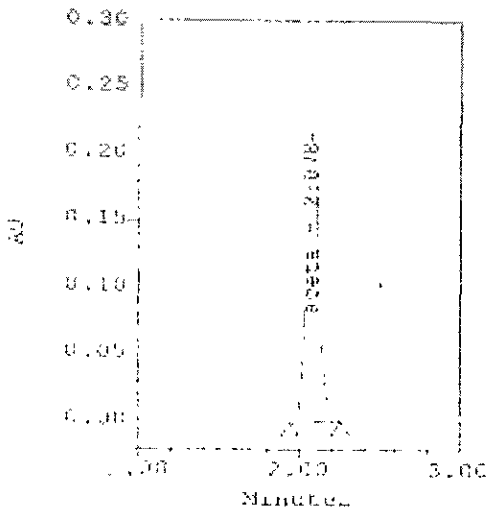


FIGURA 14-1
Acetaminofén, formulación

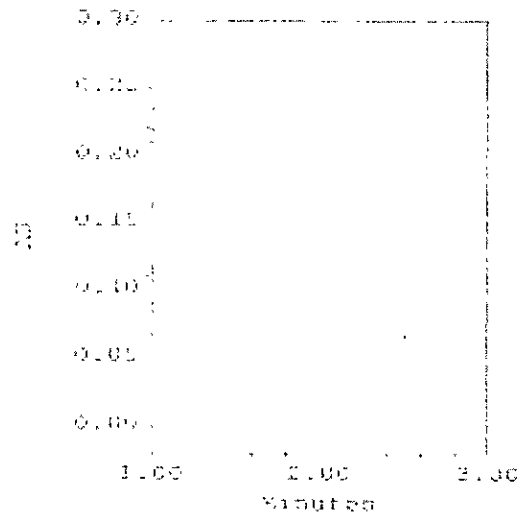


FIGURA 14-2
Acetaminofén, placebo

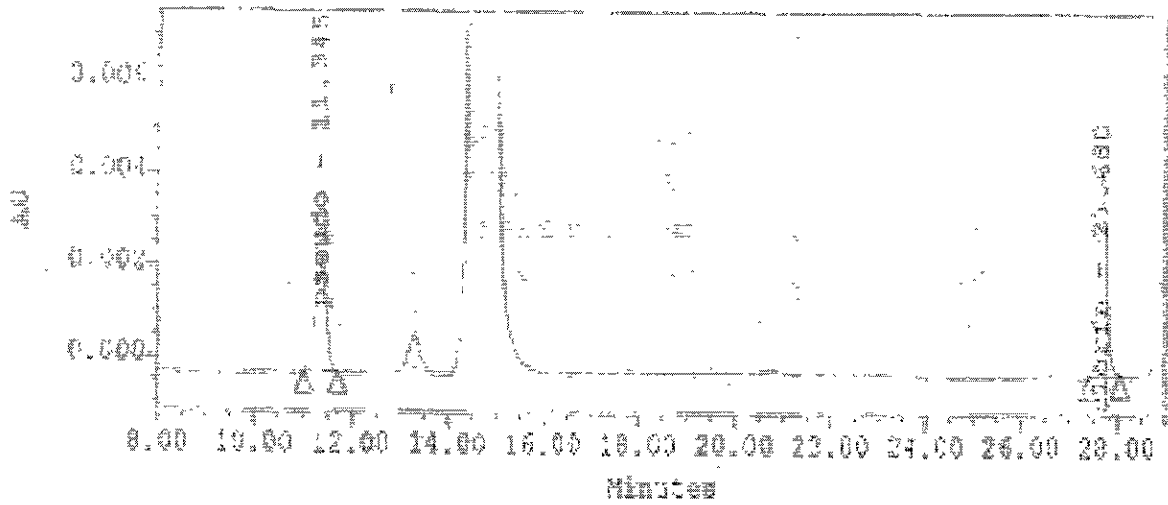


FIGURA 14-3
Pseudoefedrina y clorfeniramina, formulación

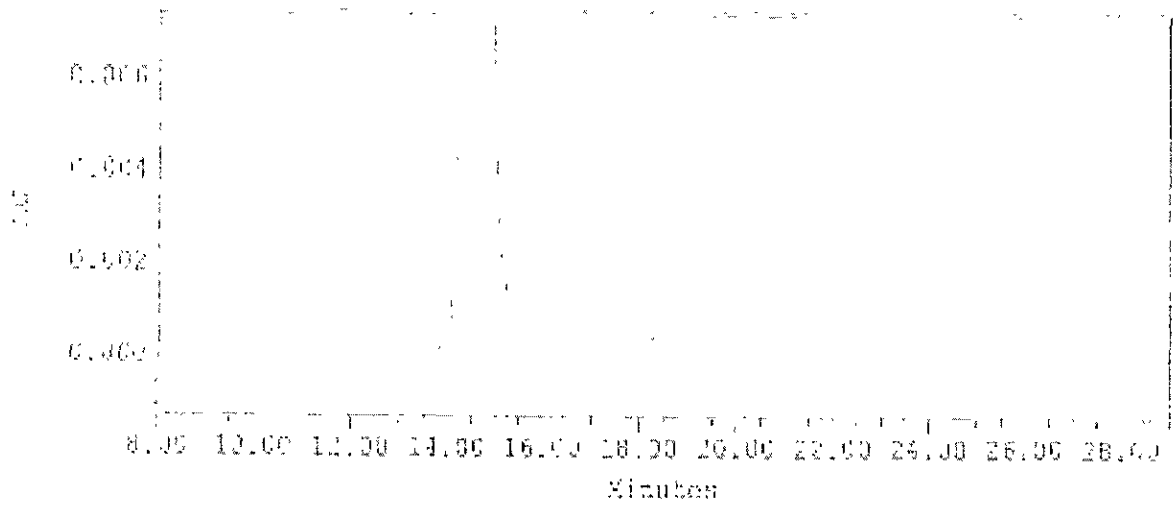


FIGURA 14-4
Pseudoefedrina y Clorfeniramina, placebo

VII-2.1.2 Especificidad a productos de degradación

De la *Figura 15-1* a la *15-8* se muestran cromatogramas de la formulación sometida a las diferentes condiciones de degradación, en los cuales, se puede apreciar que no existen señales de compuestos que eluyan al tiempo de retención de los compuestos de interés (*Figura 14*), y que, por lo tanto interfieran en su cuantificación.

De la *Figura 16-1* a la *16-10* se muestra el análisis espectral de la formulación sometida a las diferentes condiciones de degradación, en donde se aprecia que:

- Los espectros obtenidos de cada uno de los compuestos de interés en la formulación degradada en cada una de las condiciones a las que se sometió (*Gráficas tituladas Espectro-s*), no difieren de los espectros de los compuestos de interés que se obtienen al inyectar la formulación sin degradar.
- Al sobreponer los espectros de cada uno de los compuestos de interés de la solución de referencia (*Library Matches*) con los de la formulación degradada (*aceta o pseudo o clorfe*), estos se sobreponen completamente, mostrando así, que no hay diferencia entre ambos espectros (*Differences*); estos resultados se observan en las gráficas tituladas *Triple match plot* (*Figuras 16-1 a 16-10*, donde: *aceta* = acetaminofén, *pseudo* = pseudoefedrina clorhidrato, *clorfe* = clorfeniramina maleato).

Lo anterior indica que no hay evidencia de que las señales cromatográficas del acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato son impuras; por lo tanto:

El método es específico en presencia de productos de degradación.

a) Figuras 15: cromatogramas

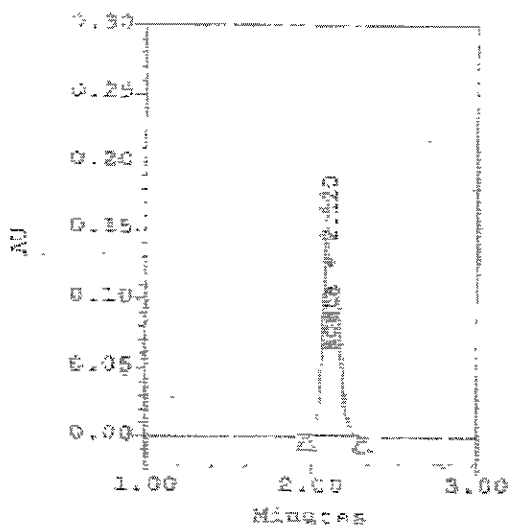


FIGURA 15-1
Hidrólisis ácida - Acetaminofén

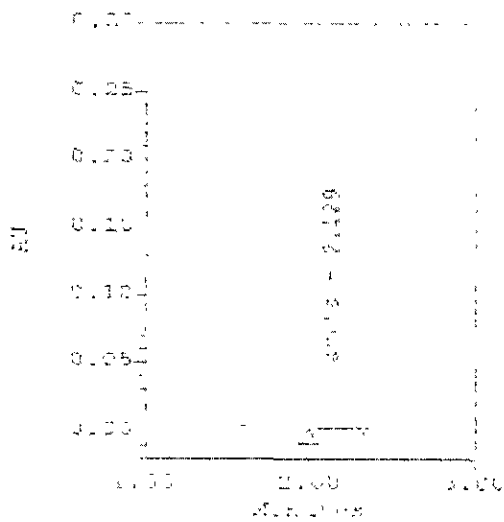


FIGURA 15-2
Hidrólisis básica - Acetaminofén

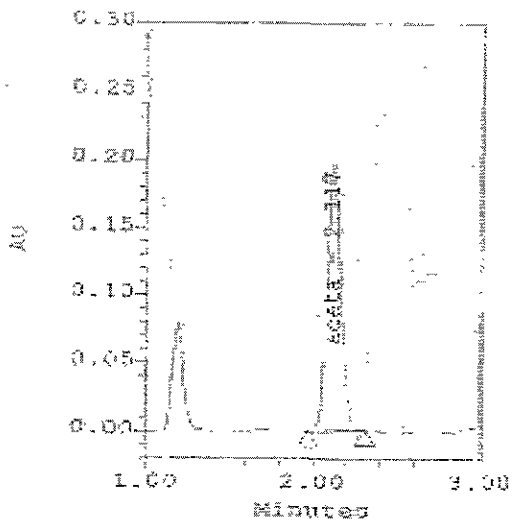


FIGURA 15-3
Oxidación - Acetaminofén

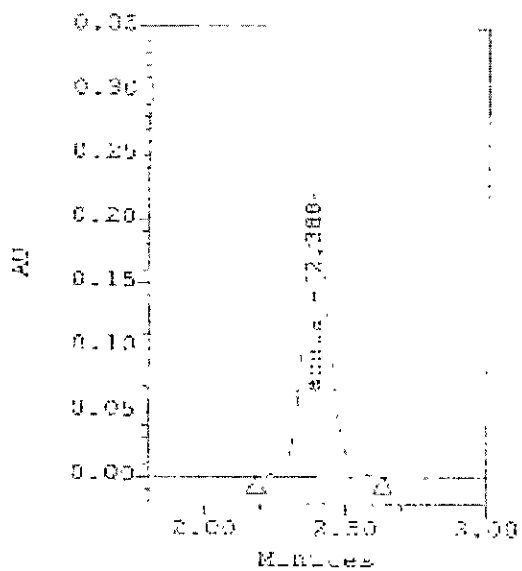


FIGURA 15-4
Fotólisis - Acetaminofén

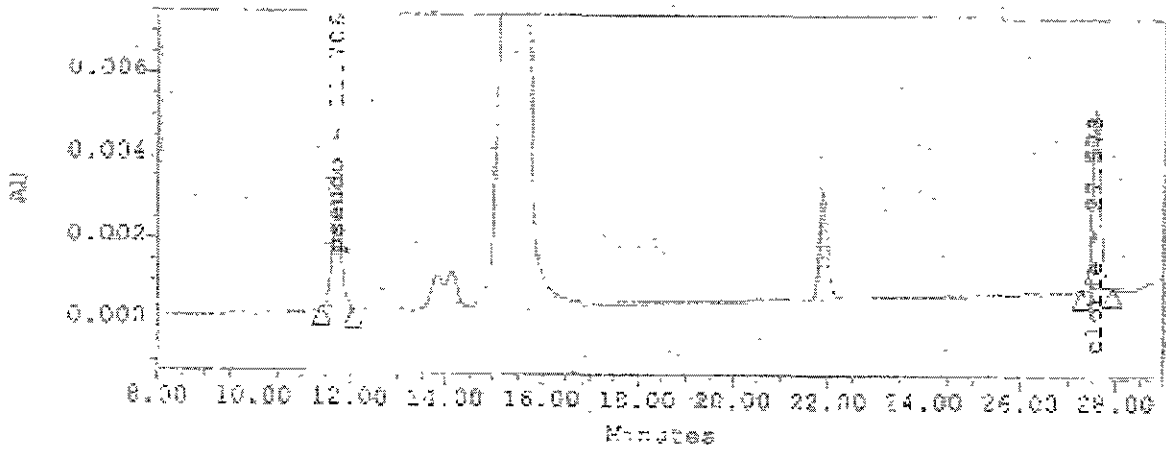


FIGURA 15-5
Hidrólisis ácida - Pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato

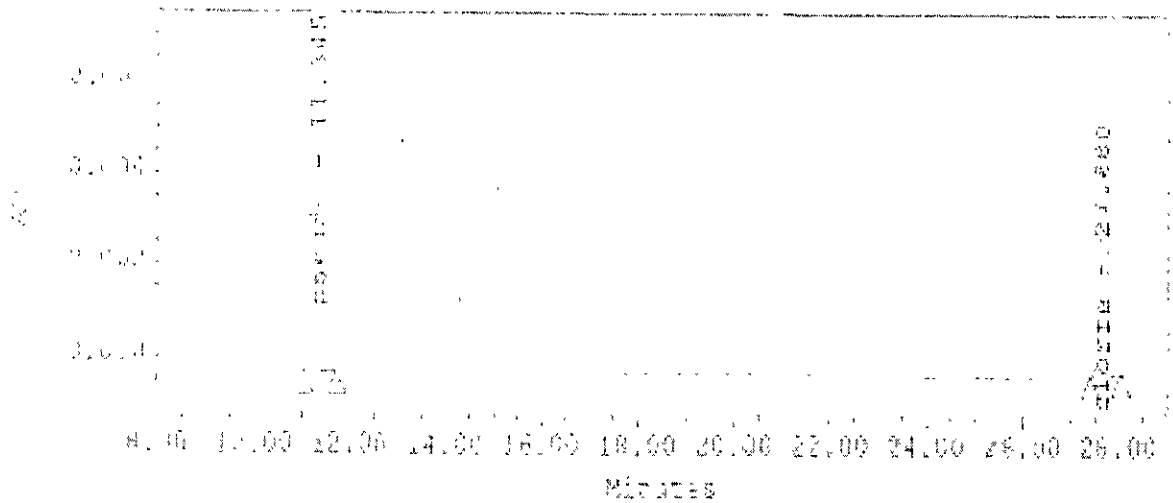


FIGURA 15-6
Hidrólisis básica - Pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato

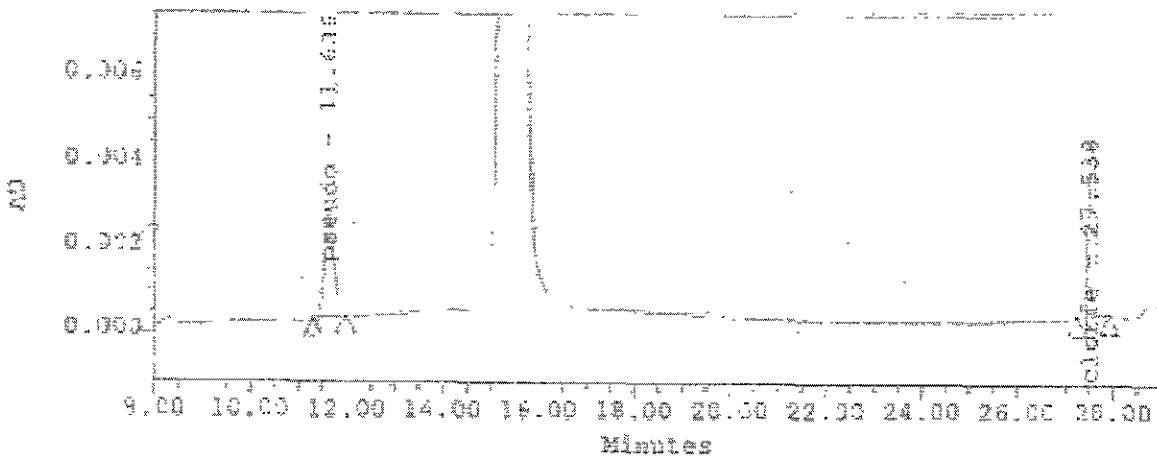


FIGURA 15-7

Oxidación - Pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato

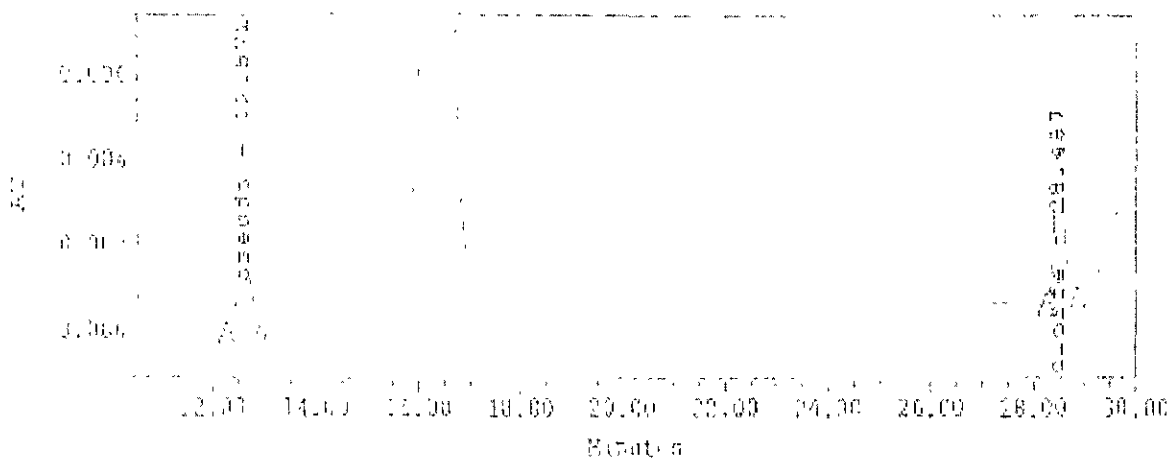


FIGURA 15-8

Fotólisis - Pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato

b) Figuras 16: análisis espectral y de pureza

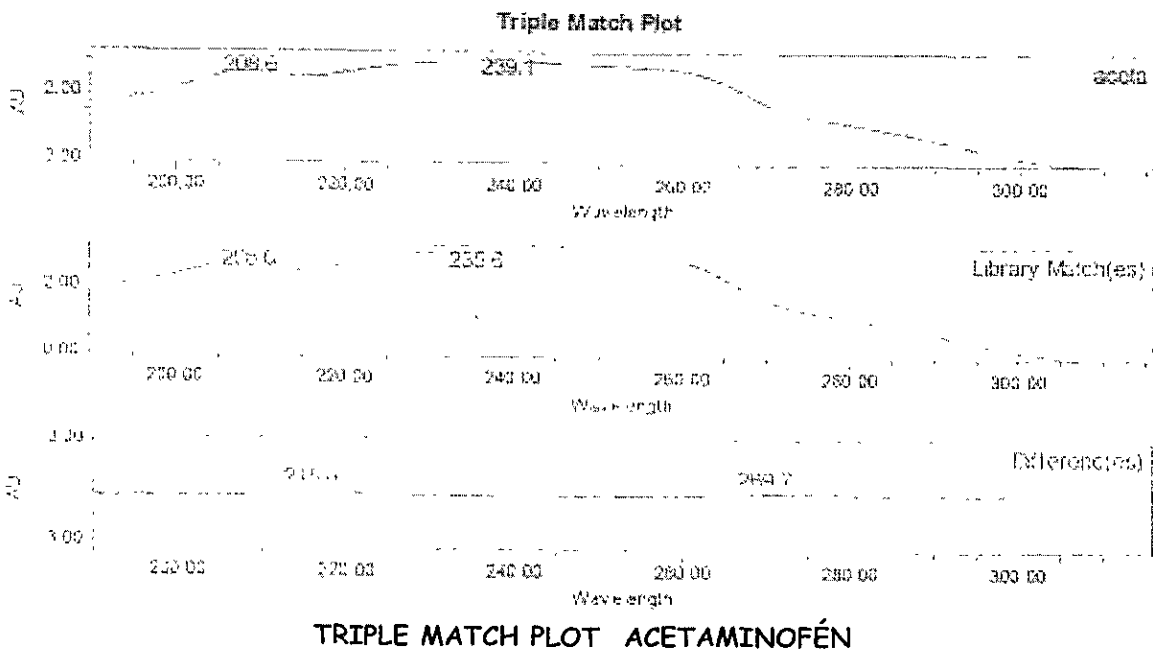
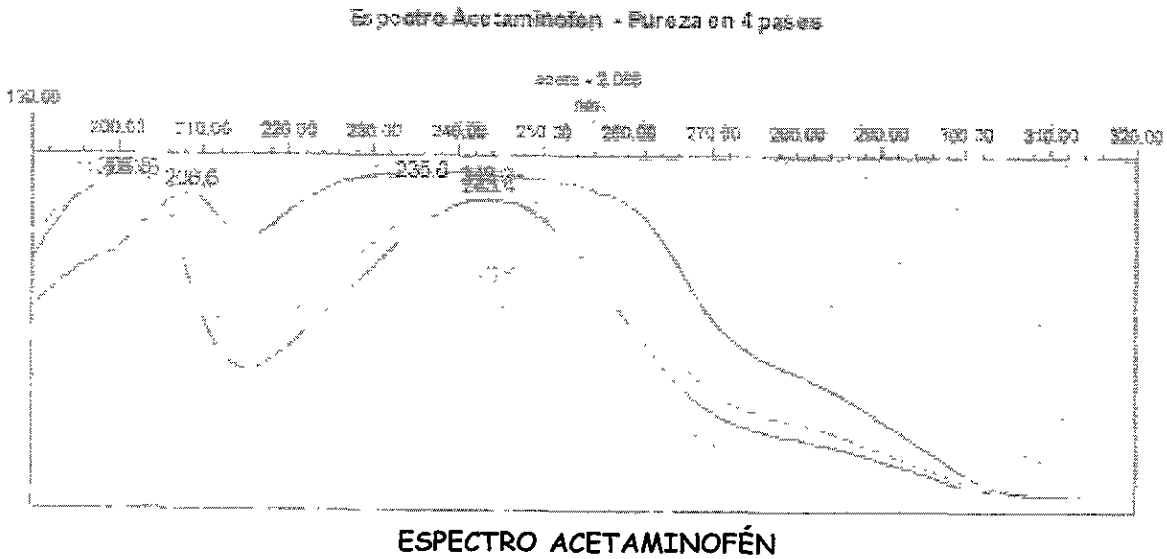
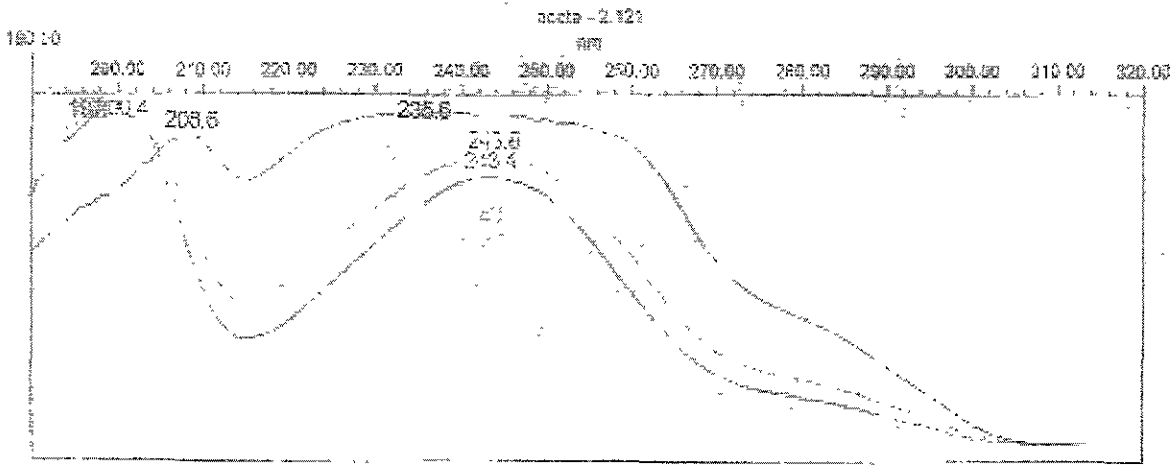
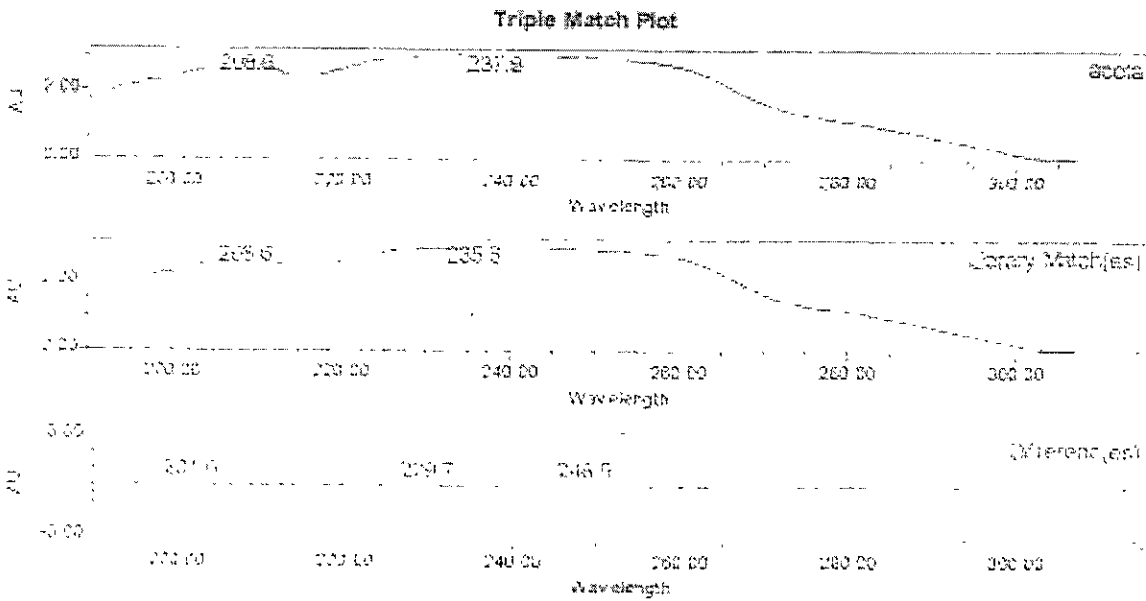


FIGURA 16-1
Formulación sin degradar

Espectro Acetaminofen - Purca en 4 pasos



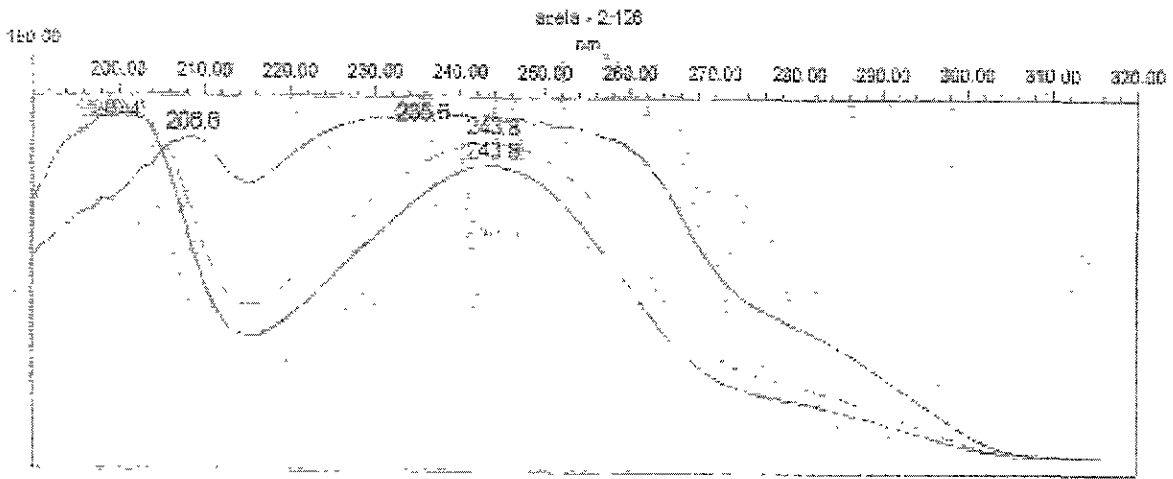
ESPECTRO ACETAMINOFÉN



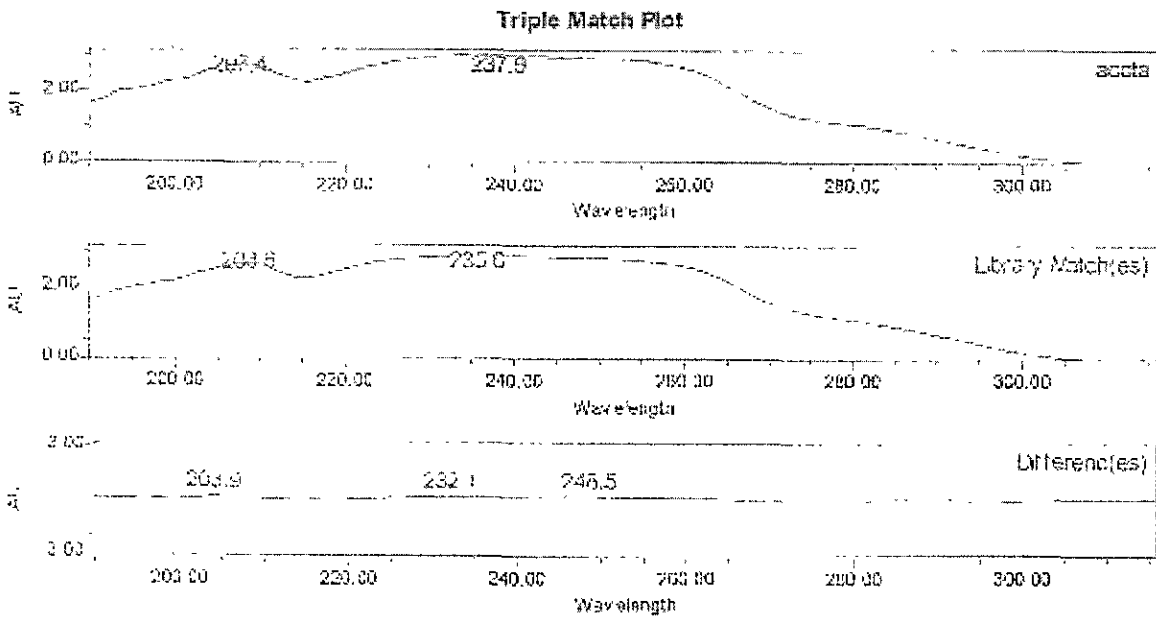
TRIPLE MATCH PLOT ACETAMINOFÉN

FIGURA 16-2
Hidrólisis ácida

Espetro Acetaminofen - Pureza en 4 pases



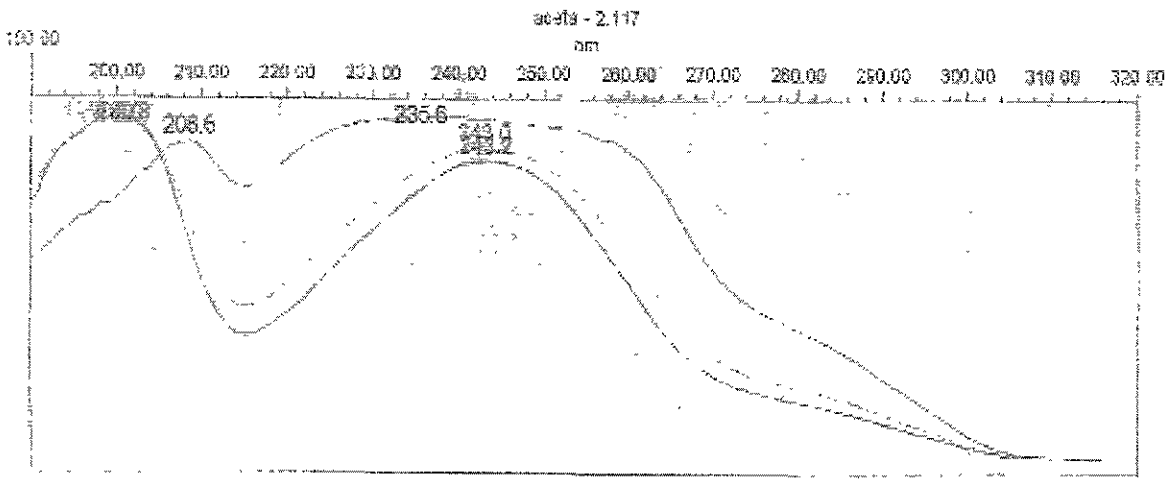
ESPECTRO ACETAMINOFÉN



TRIPLE MATCH PLOT ACETAMINOFÉN

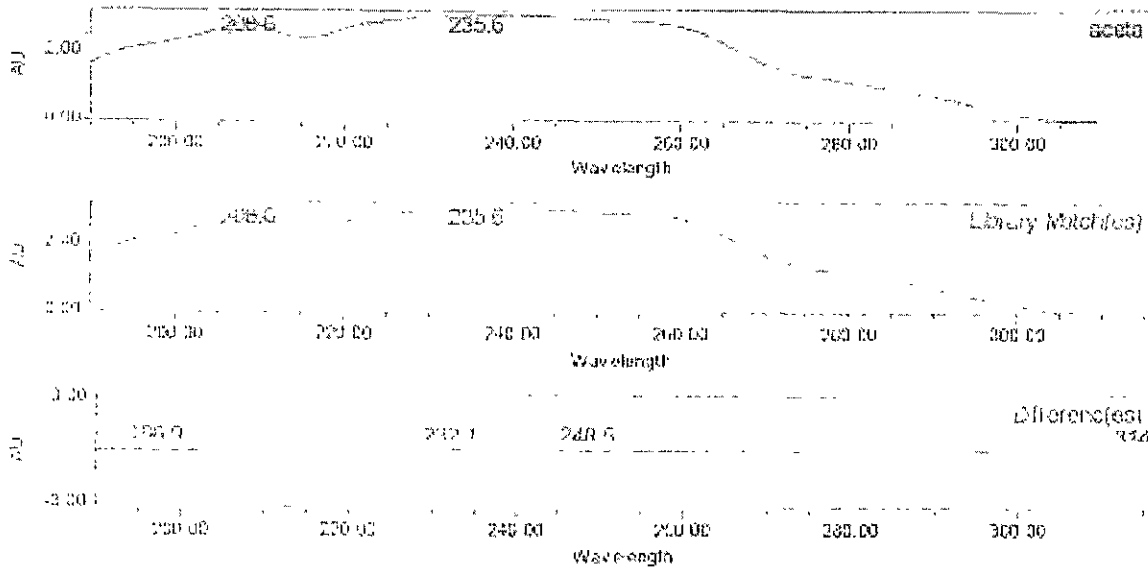
FIGURA 16-3
Hidrólisis básica

Espectro Acetaminofén - Pureza en 4 pasos



ESPECTRO ACETAMINOFÉN

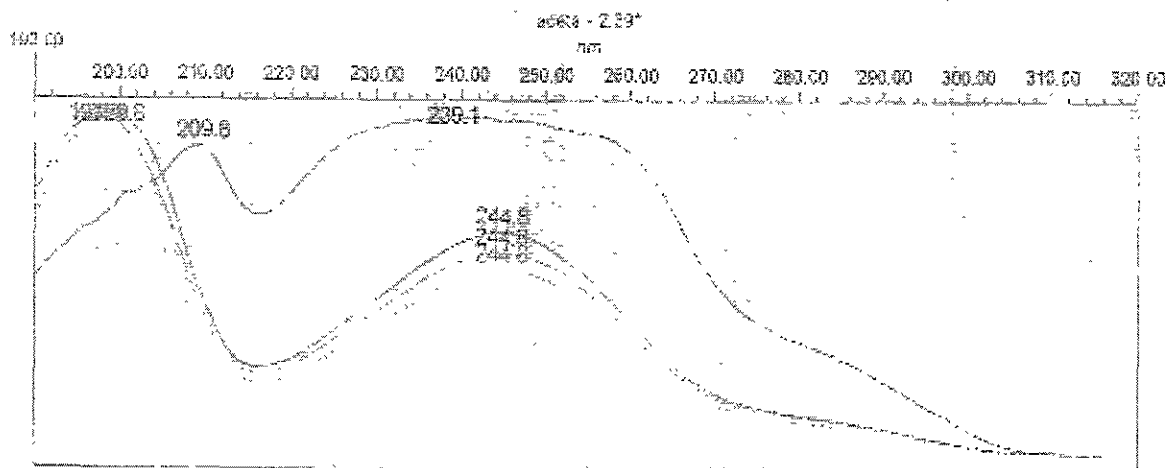
Triple Match Plot



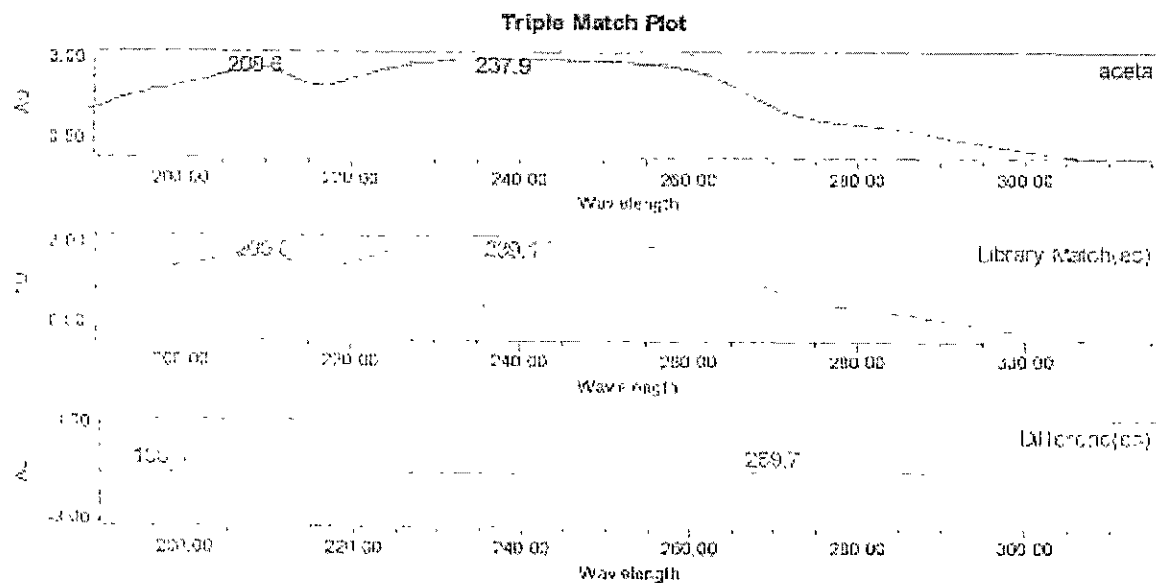
TRIPLE MATCH PLOT ACETAMINOFÉN

FIGURA 16-4
Oxidación

Espectro Acetaminofen - Pureza en 4 pasos



ESPECTRO ACETAMINOFÉN



TRIPLE MATCH PLOT ACETAMINOFÉN

FIGURA 16-5
Fotólisis

ESPECTROS

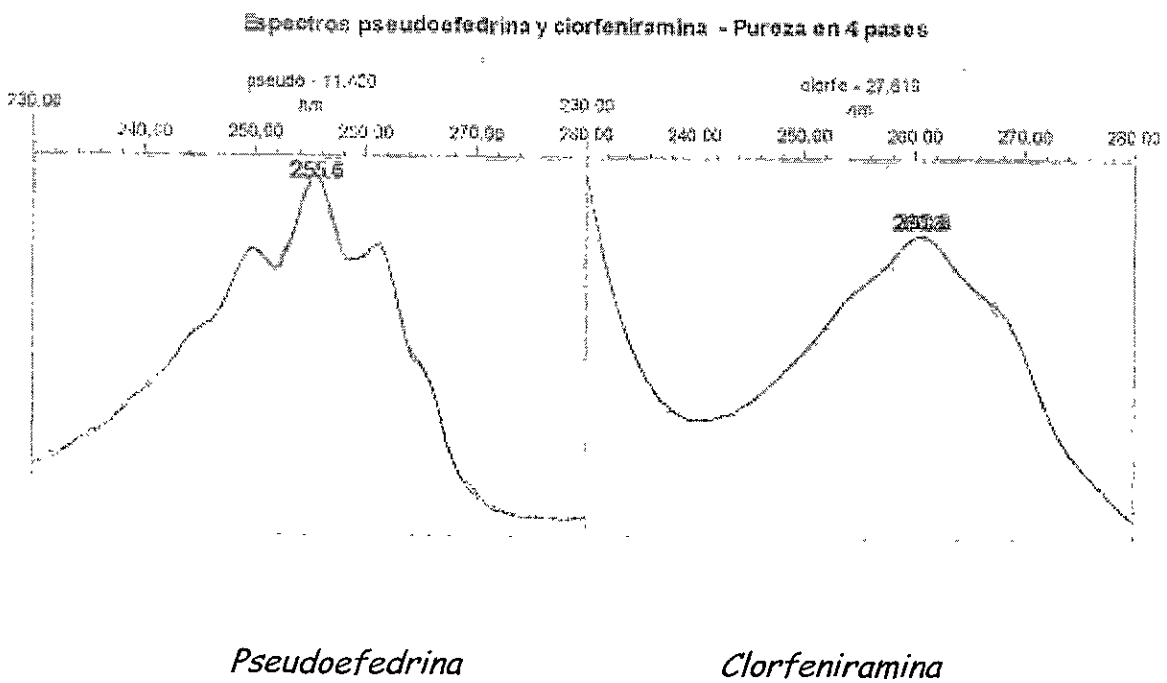
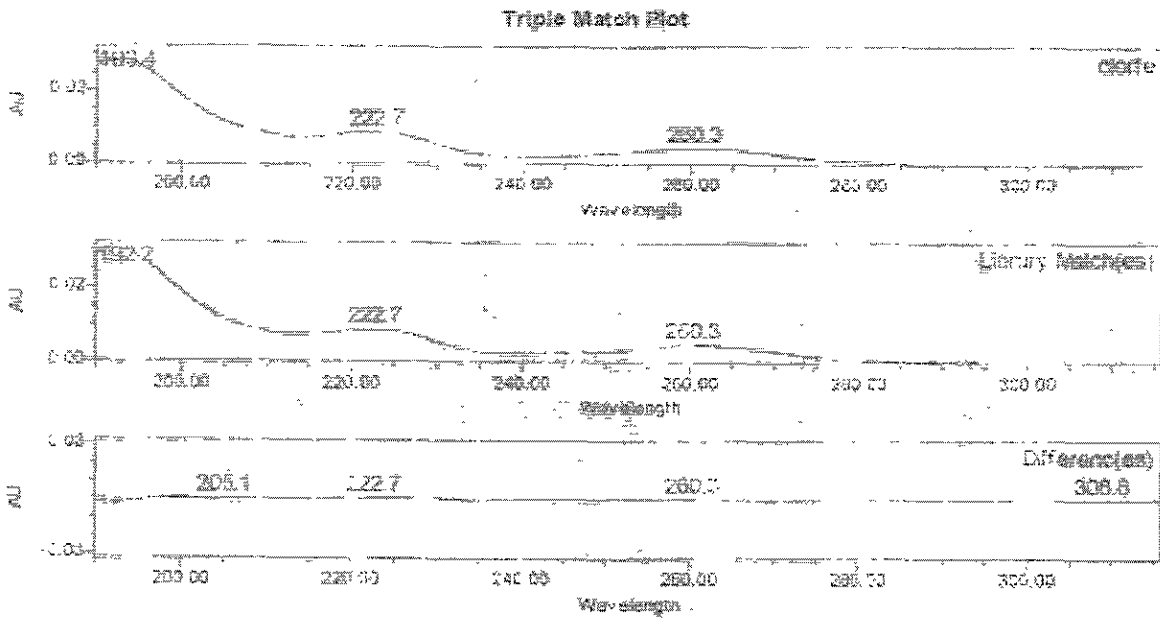
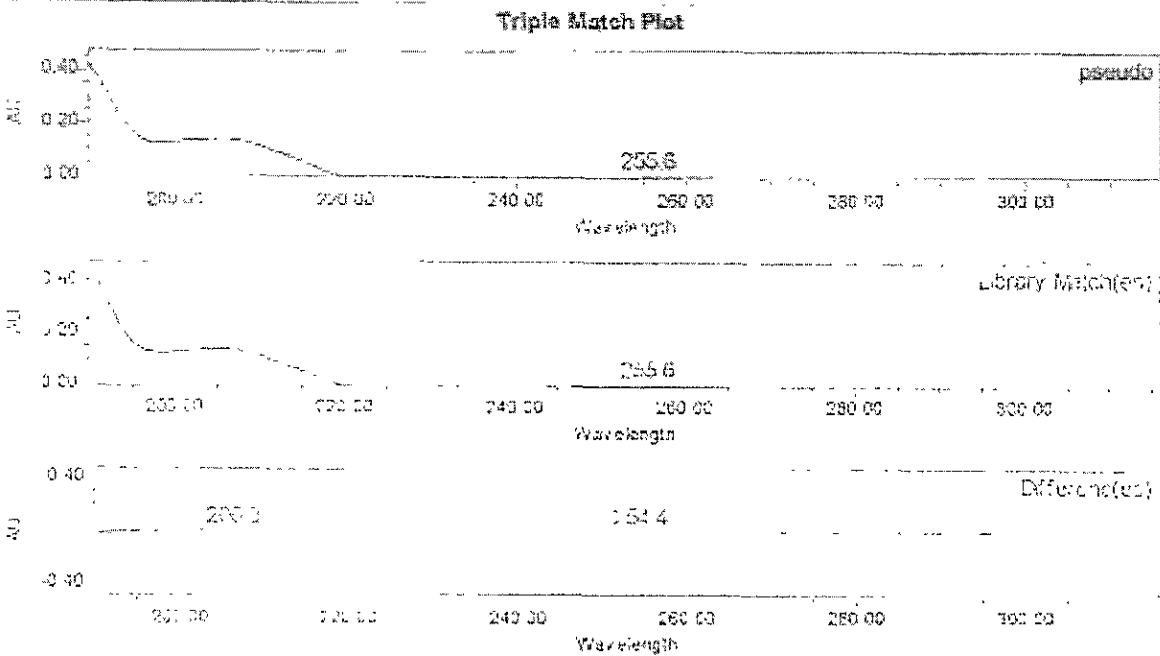


FIGURA 16-6
Formulación sin degradar



TRIPLE MATCH PLOT CLORFENIRAMINA

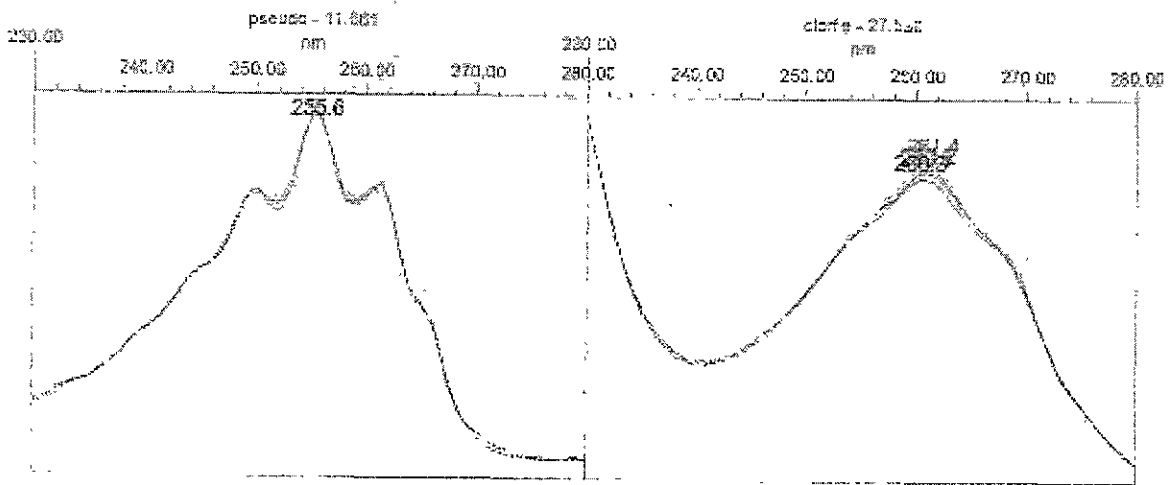


TRIPLE MATCH PLOT PSEUDOEFEDRINA

FIGURA 16-6
Formulación sin degradar

ESPECTROS

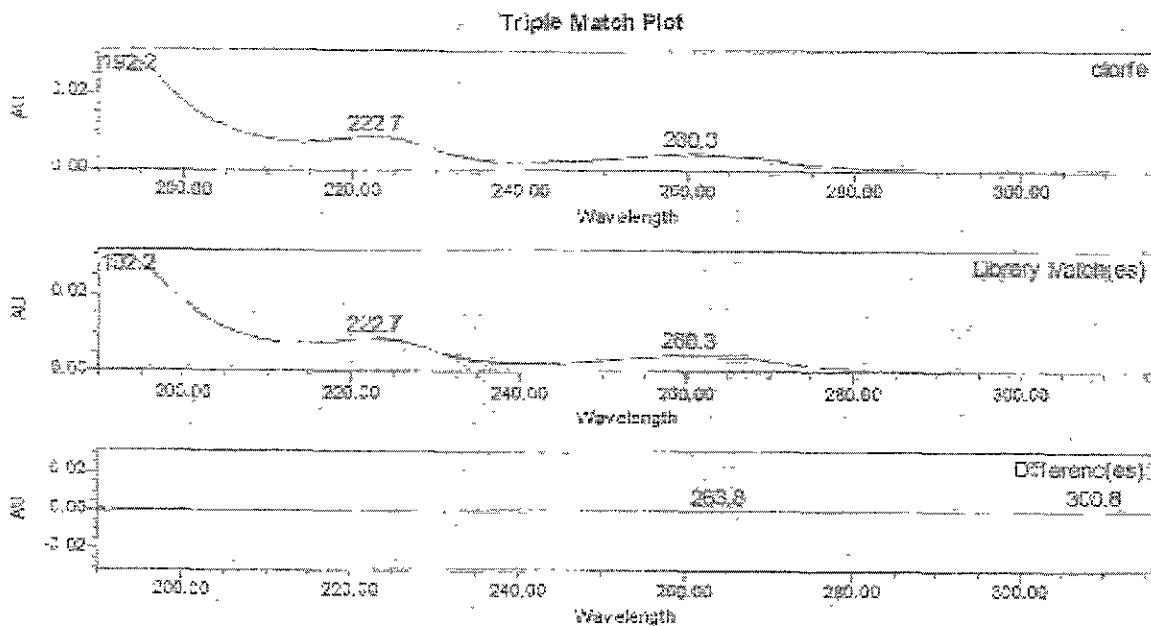
Espectros pseudoefedrina y clorfeniramina - Pureza en 4 pases



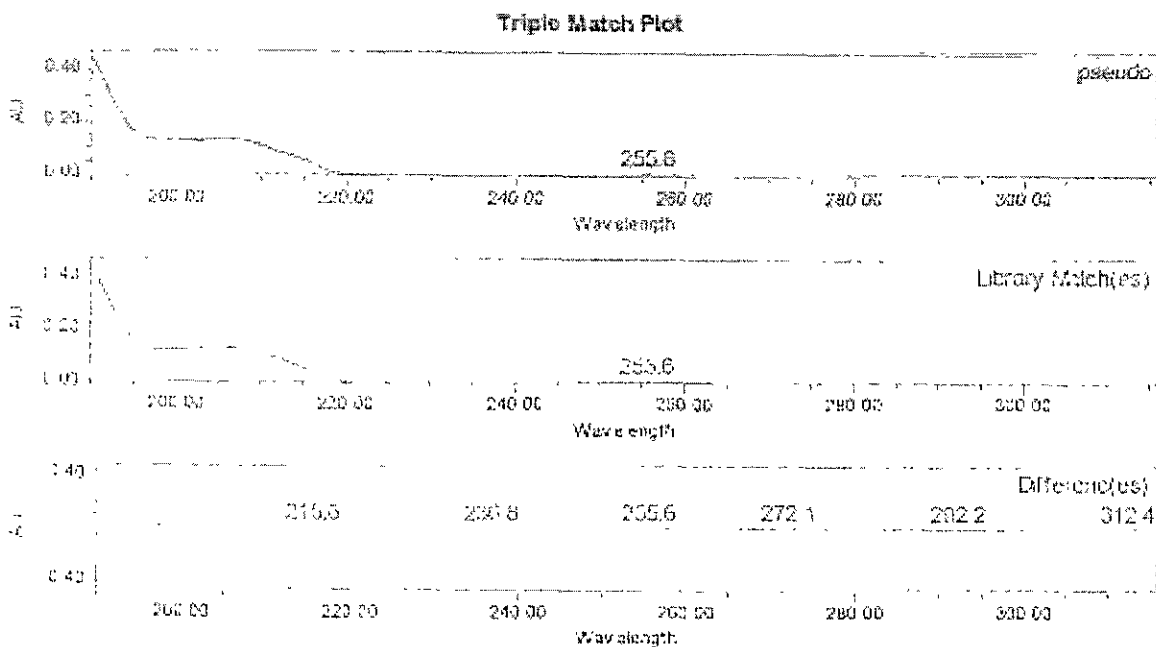
Pseudoefedrina

Clorfeniramina

FIGURA 16-7
Hidrólisis ácida



TRIPLE MATCH PLOT CLORFENIRAMINA



TRIPLE MATCH PLOT CLORFENIRAMINA

FIGURA 16-7
Hidrólisis ácida

ESPECTROS

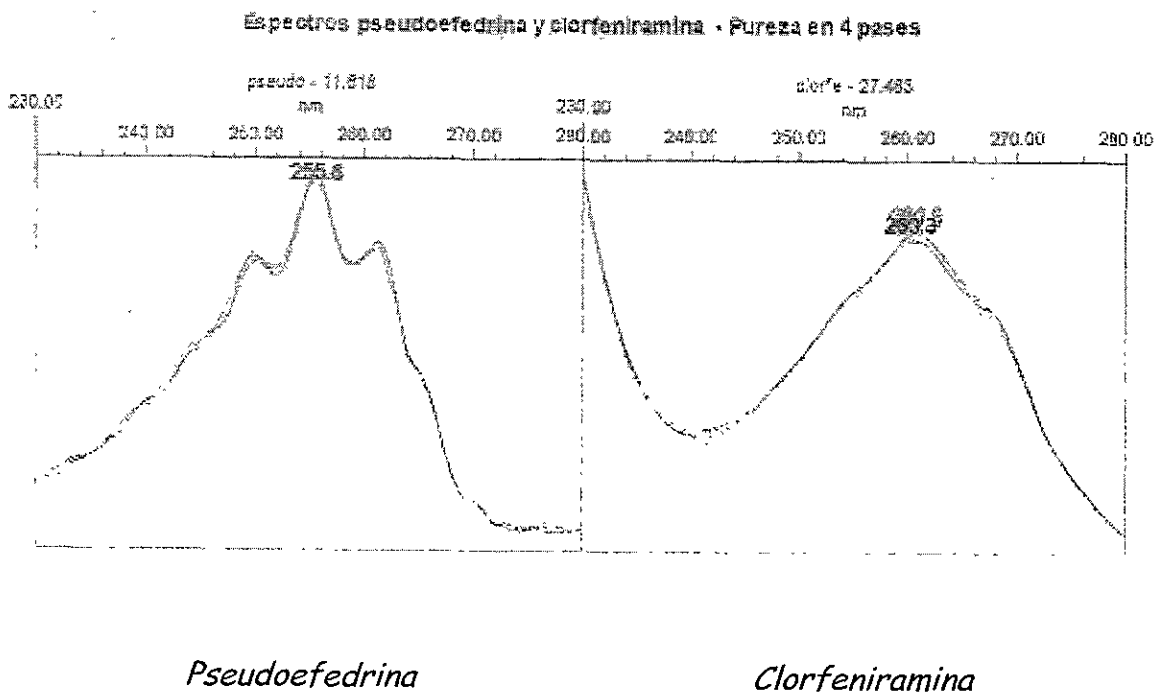
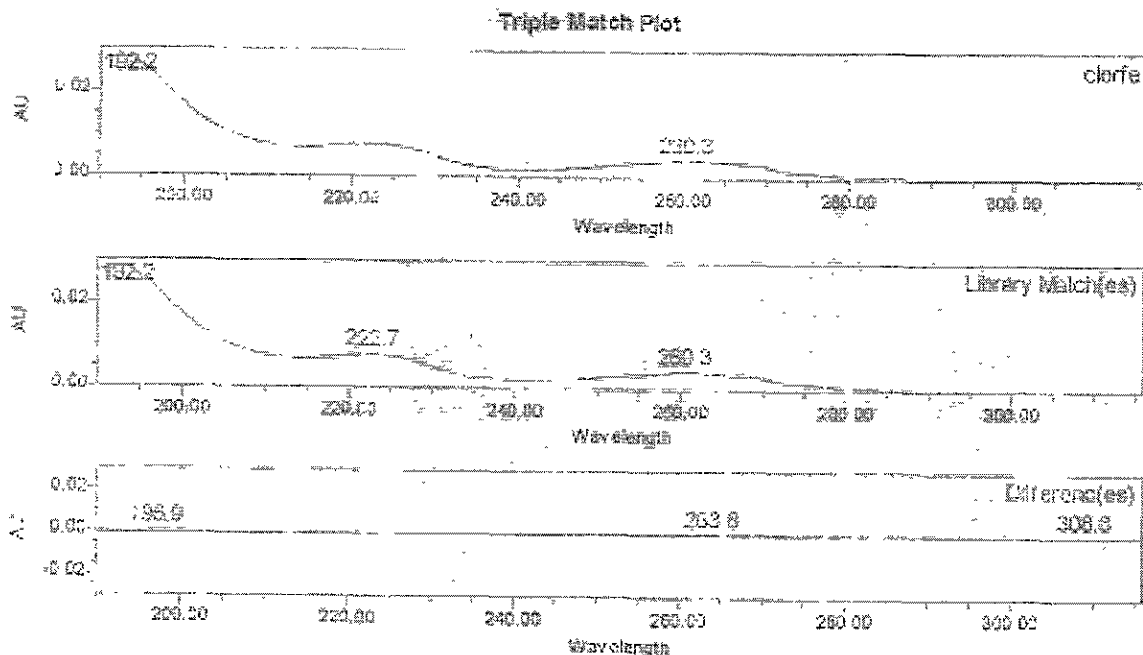
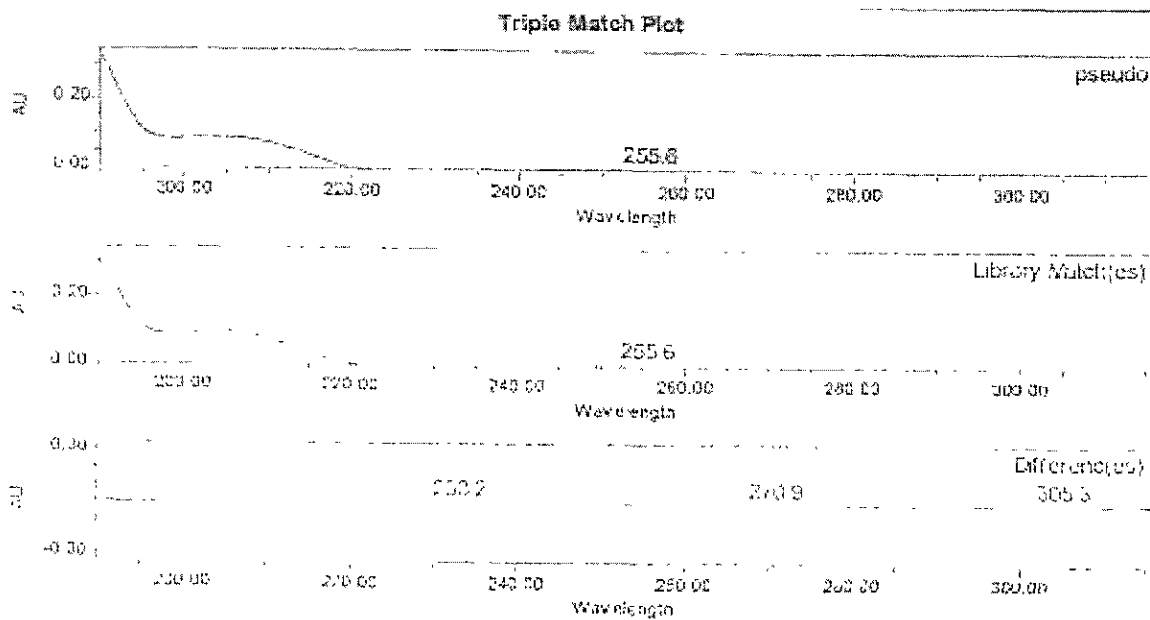


FIGURA 16-8
Hidrólisis básica



TRIPLE MATCH PLOT CLORFENIRAMINA



TRIPLE MATCH PLOT PSEUDOEFEDRINA

FIGURA 16-8
Hidrólisis básica

ESPECTROS

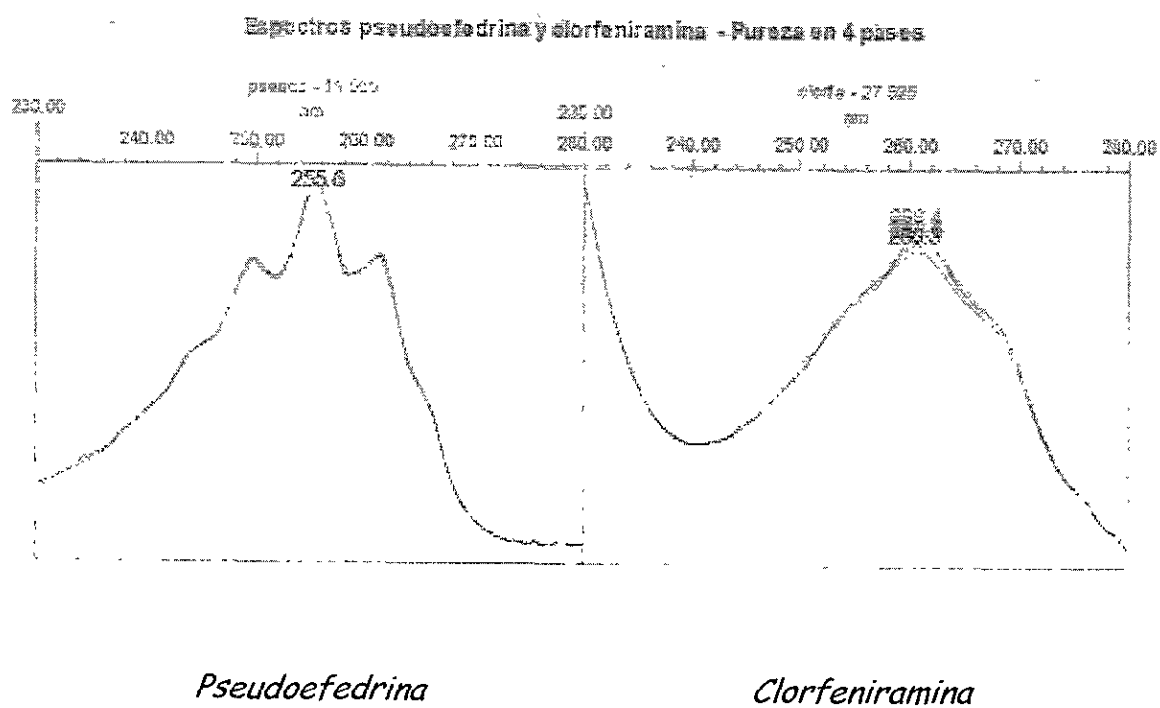
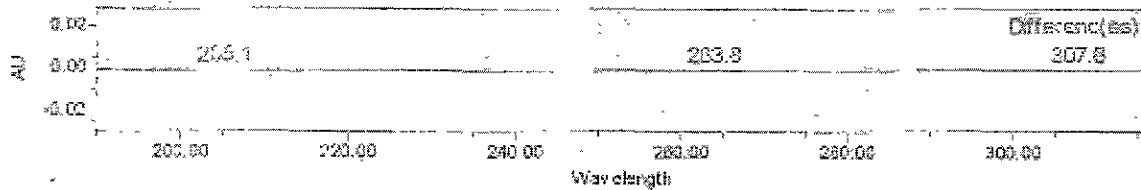
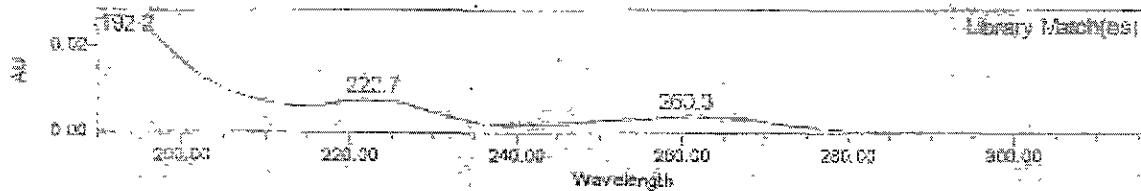
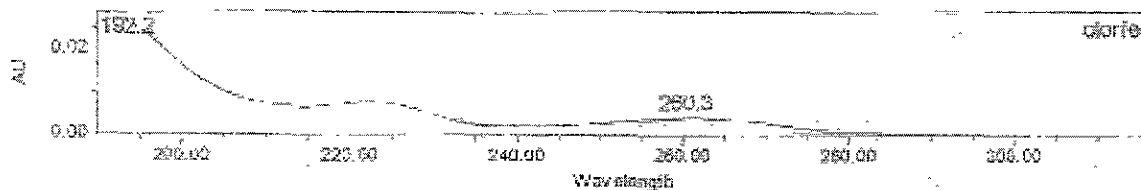


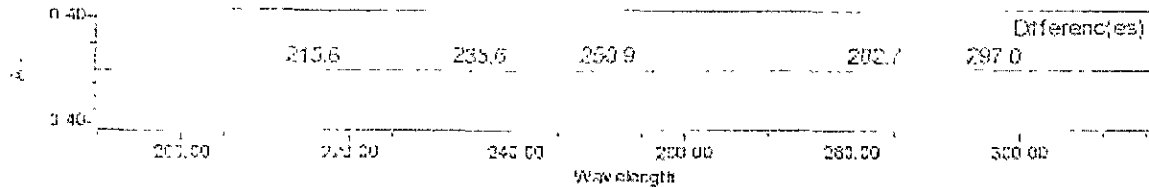
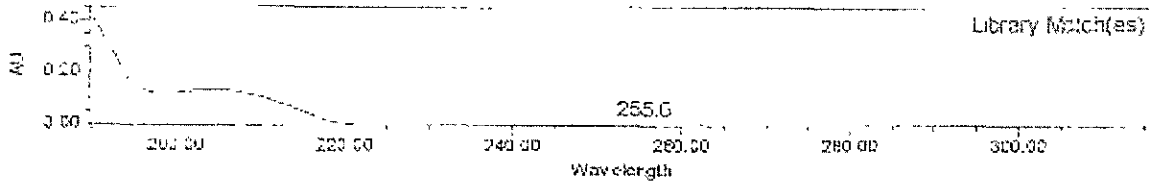
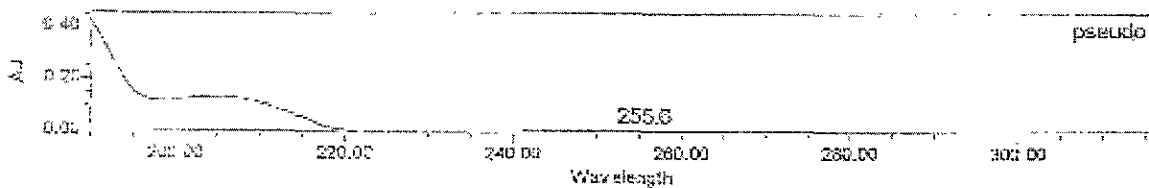
FIGURA 16-9
Oxidación

Triple Match Plot



TRIPLE MATCH PLOT CLORFENIRAMINA

Triple Match Plot

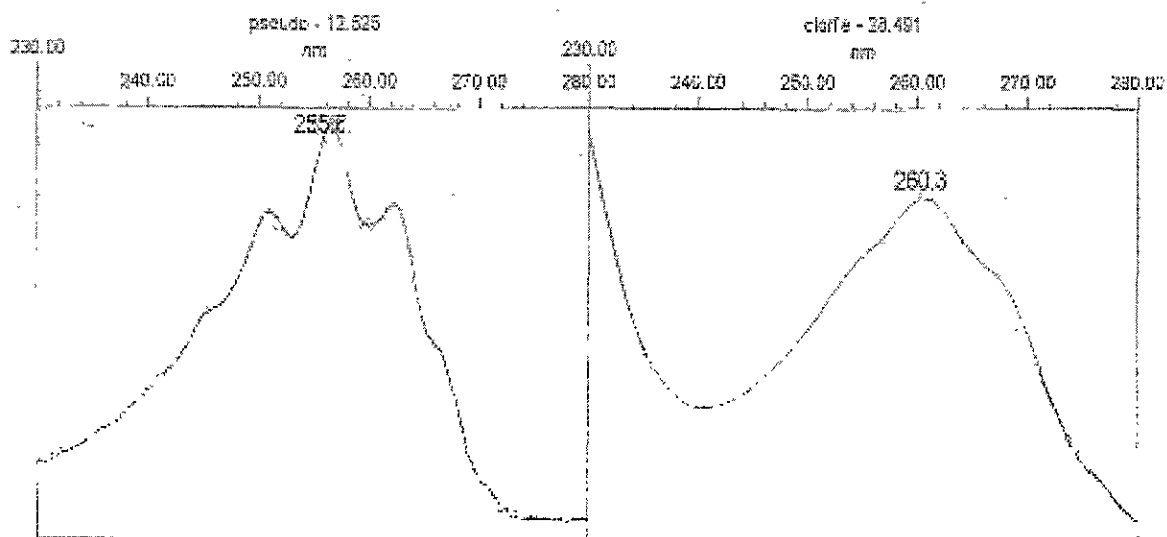


TRIPLE MATCH PLOT PSEUDOFEDRINA

FIGURA 16-9
Oxidación

ESPECTROS

Espectros pseudoefedrina y clorfeniramina - Pureza en 4 pases



Pseudoefedrina

Clorfeniramina

FIGURA 16-10
Fotólisis

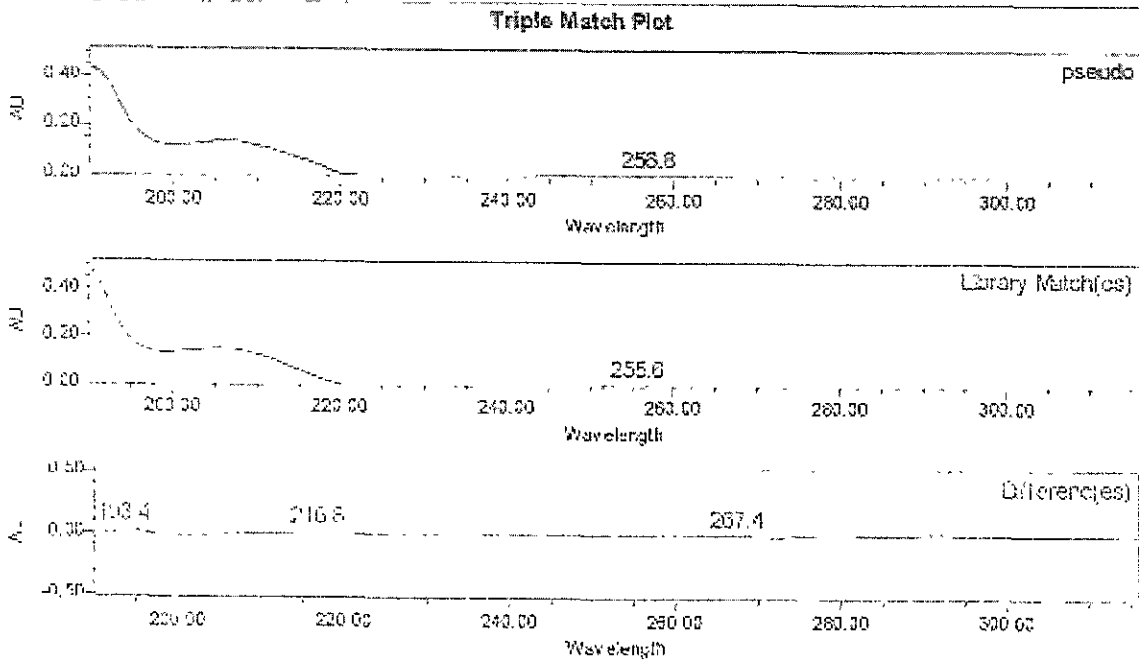
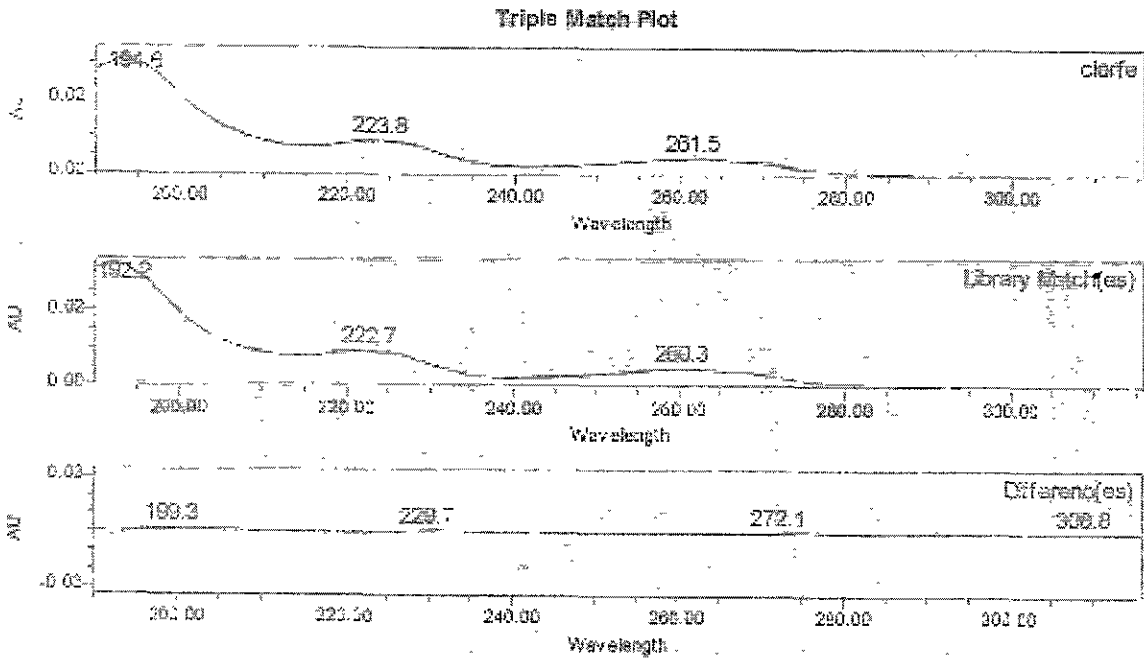


FIGURA 16-10
Fotólisis

VII-2.2 Linealidad del sistema

En la *Tabla 5* se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (x) a la concentración de acetaminofén o pseudoefedrina clorhidrato o clorfeniramina maleato y como variable dependiente (y) a la respuesta del compuesto de interés correspondiente; se generaron las gráficas correspondientes para cada principio activo y se determinó la ecuación de la recta.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Para los tres compuestos analizados, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor que 0.98 y el coeficiente de variación del factor respuesta es menor que 2.0 %, por lo que, se cumple con los criterios de aceptación y se demuestra que el sistema es lineal en el intervalo de 60 a 140 % de la concentración de trabajo.

También se determinó el intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen el cual, incluye al cero (*Tabla 5, partes A2 y C2*) para acetaminofén y clorfeniramina maleato; esto indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor calculado y el cero; por lo tanto, la cuantificación de estos activos se puede realizar por comparación con un estándar, es decir, de manera puntual.

La pseudoefedrina clorhidrato presentó un comportamiento lineal, pero, el intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen no incluyó al cero (*Tabla 5, parte B2*); por lo que, se decidió utilizar una curva de calibración para su cuantificación y por lo tanto, también para la cuantificación de los otros dos compuestos de interés.

En la *Figura 17* se muestran las gráficas correspondientes, en donde se observa que existe una relación lineal entre la concentración de los compuestos analizados y su respuesta.

TABLA 5
Linealidad del sistema

A. Acetaminofén

A1. Respuesta de acetaminofén en cada nivel y precisión del factor respuesta

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	Respuesta (área)	Factor respuesta
60	0.3840	851129	2216482
60	0.3840	843885	2197617
60	0.3840	851012	2216177
80	0.5120	1136150	2219043
80	0.5120	1149096	2244328
80	0.5120	1130054	2207137
100	0.6400	1443433	2255364
100	0.6400	1421014	2220334
100	0.6400	1411800	2205938
120	0.7680	1709916	2226453
120	0.7680	1700543	2214249
120	0.7680	1702091	2216264
140	0.8960	1978522	2208172
140	0.8960	1986244	2216790
140	0.8960	1979933	2209747

Factor respuesta:

No. de datos = 15

Promedio = 2218273

D.E. = 1.47E+04

C.V. (%) = 0.7

A2. Ecuación de la recta

$$Y = 2212134 X + 3888$$

$$r^2 = 0.9995$$

A3. Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen

Límite superior = 22544

Límite inferior = -14766

B. Pseudoefedrina clorhidrato

B1. Respuesta de pseudoefedrina clorhidrato en cada nivel y precisión del factor respuesta

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	Respuesta (área)	Factor respuesta
60	0.0360	20404	566778
60	0.0360	20387	566306
60	0.0360	20011	555861
80	0.0480	27479	572479
80	0.0480	27340	569583
80	0.0480	28373	591104
100	0.0600	35506	591767
100	0.0600	34762	579367
100	0.0600	34243	570717
120	0.0720	42174	585750
120	0.0720	42029	583736
120	0.0720	42066	584250
140	0.0840	48960	582857
140	0.0840	49224	586000
140	0.0840	49272	586571

Factor respuesta:

No. de datos = 15

Promedio = 578208

D.E. = 1.06E+04

C.V. (%) = 1.8

B2. Ecuación de la recta

$$Y = 601069 X - 1248$$

$$r^2 = 0.9988$$

B3. Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen

Límite superior = -500

Límite inferior = -1996

C. Clorfeniramina maleato

C1. Respuesta de clorfeniramina maleato en cada nivel y precisión del factor respuesta

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	Respuesta (área)	Factor respuesta
60	0.00240	28140	11725000
60	0.00240	28061	11692083
60	0.00240	28142	11725833
80	0.00320	37918	11849375
80	0.00320	38131	11915938
80	0.00320	37175	11617188
100	0.00400	46746	11686500
100	0.00400	47232	11808000
100	0.00400	46704	11676000
120	0.00480	56824	11838333
120	0.00480	57370	11952083
120	0.00480	56374	11744583
140	0.00560	66138	11810357
140	0.00560	65981	11782321
140	0.00560	65853	11759464

Factor respuesta:

No. de datos = 15

Promedio = 11772204

D.E. = 9.20E+04

C.V. (%) = 0.8

C2. Ecuación de la recta

$$Y = 11858416 X - 314$$

$$r^2 = 0.9994$$

C3. Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen

Límite superior = 410

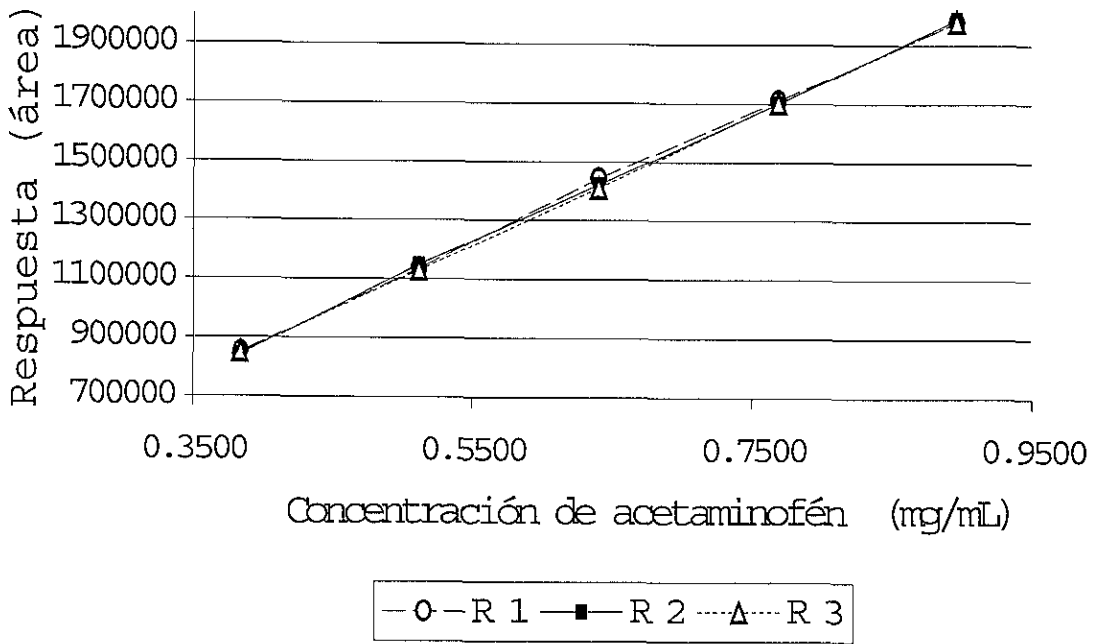
Límite inferior = -1039

A. Acetaminofén

$$Y = 2212134 X + 3888$$

$$r^2 = 0.9995$$

Concentración de acetaminofén vs respuesta



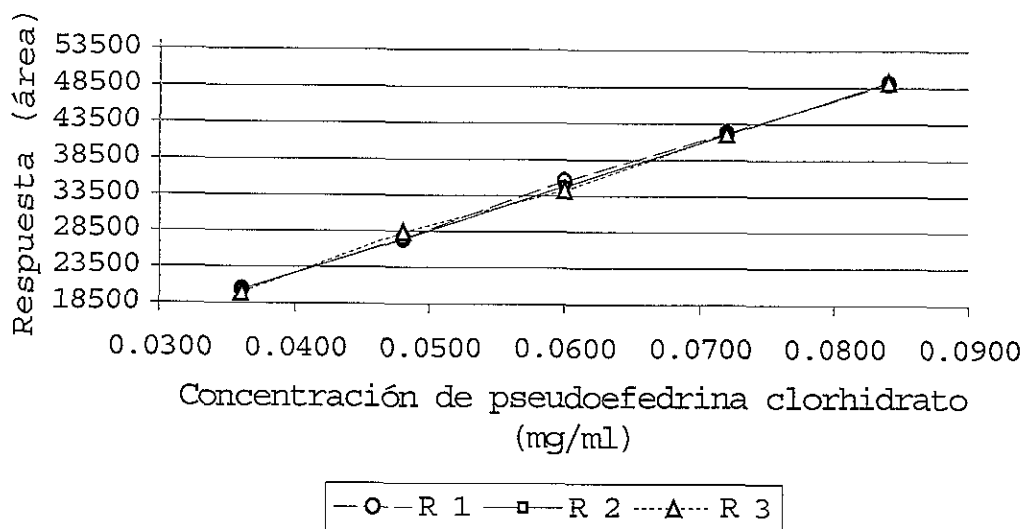
R = Réplica

FIGURA 17
GRÁFICA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

B. Pseudoefedrina clorhidrato

$$Y = 601069 X - 1248$$
$$r^2 = 0.9988$$

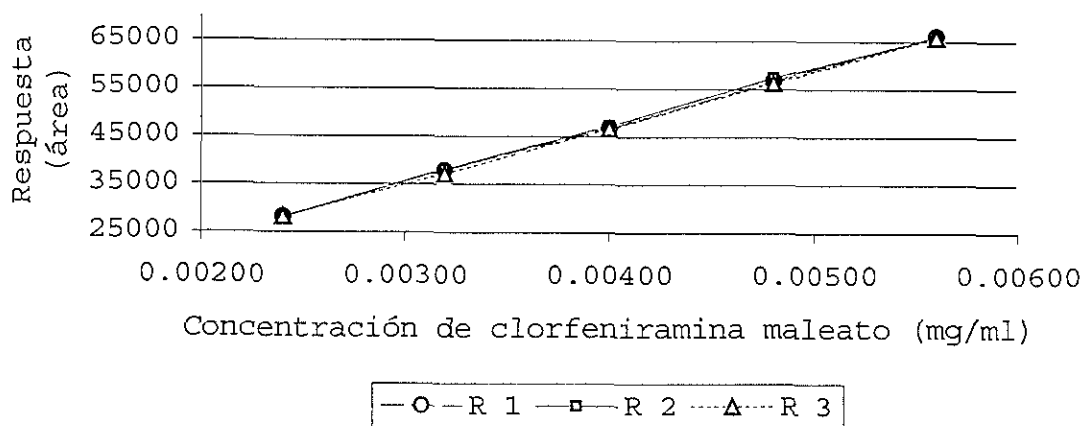
Concentración de pseudoefedrina vs respuesta



C. Clorfeniramina maleato

$$Y = 11858416 X - 314$$
$$r^2 = 0.9994$$

Concentración de clorfeniramina vs respuesta



R = Réplica

FIGURA 17
GRÁFICAS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

VII-2.3 Precisión del sistema

En la *Tabla 6* se encuentran los datos obtenidos de la evaluación de la precisión del sistema; en la cual, se aprecia que, para los tres compuestos analizados, el sistema es preciso ya que, la respuesta de 6 inyecciones sucesivas tienen un coeficiente de variación menor que 1.5 %.

TABLA 6
Precisión del sistema

A. Acetaminofén

Inyección	Concentración (mg/ml)	Respuesta (área)
1	0.6400	1419029
2	0.6400	1409267
3	0.6400	1411686
4	0.6400	1407008
5	0.6400	1413449
6	0.6400	1408801
No. de datos =		6
Promedio =		1411540
D.E. =		4311.7
C.V. (%) =		0.3

B. Pseudoefedrina clorhidrato

Inyección	Concentración (mg/ml)	Respuesta (área)
1	0.0600	33923
2	0.0600	35138
3	0.0600	34606
4	0.0600	34604
5	0.0600	34085
6	0.0600	34305
No. de datos =		6
Promedio =		34444
D.E. =		436.5
C.V. (%) =		1.3

C. Clorfeniramina maleato

Inyección	Concentración (mg/ml)	Respuesta (área)
1	0.00400	46481
2	0.00400	46093
3	0.00400	46202
4	0.00400	46348
5	0.00400	46151
6	0.00400	46567
No. de datos =		6
Promedio =		46307
D.E. =		190.3
C.V. (%) =		0.4

VII-2.4 Linealidad del método

En la *Tabla 7* se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (x) a los mg adicionados de acetaminofén o pseudoefedrina clorhidrato o clorfeniramina maleato de placebos cargados y como variable dependiente (y) a los mg recuperados del compuesto de interés; se graficaron y se determinó la ecuación de la recta.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

El promedio del porcentaje recuperado para cada compuesto de interés, se encuentra entre 98.0 y 102.0 %; y el coeficiente de variación es menor que 2.0 %.

Para los tres compuestos de interés, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor que 0.98, la ordenada al origen no es estadísticamente diferente de cero y la pendiente no es estadísticamente diferente a uno, con un intervalo de confianza al 95 %; cumpliendo así, con los criterios de aceptación que demuestran que, el método es lineal en el intervalo de 60 a 140 % de la concentración establecida.

En la *Figura 18* se muestran las gráficas correspondientes, en donde se observa que existe una relación lineal entre los mg adicionados de acetaminofén o pseudoefedrina clorhidrato o clorfeniramina maleato y los mg recuperados.

TABLA 7
Linealidad del método

A. Acetaminofén

A1. Miligramos recuperados de acetaminofén en cada nivel

Nivel (%)	mg adicionados	mg recuperados
60.0	9.6	9.6
60.0	9.6	9.5
60.0	9.6	9.7
100.0	16.0	15.9
100.0	16.0	16.0
100.0	16.0	16.2
140.0	22.4	22.3
140.0	22.4	22.6
140.0	22.4	22.8

A2. Ecuación de la recta

$$Y = 1.0131 X - 0.1497$$

$$r^2 = 0.9990$$

A3. Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada del origen y la pendiente

- Ordenada al origen

Límite superior = 0.311

Límite inferior = -0.610

- Pendiente

Límite superior = 1.0405

Límite inferior = 0.9858

A4. Porcentaje recuperado de acetaminofén en cada nivel

Réplica	Porcentaje recuperado			Global
	Nivel:			
	60 %	100 %	140 %	
1	99.6	99.5	99.4	
2	99.1	99.8	100.9	
3	101.3	101.0	102.0	
n =	3	3	3	9
D. E. =	1.130	0.768	1.294	1.005
Promedio =	100.0	100.1	100.7	100.3
C.V. (%) =	1.1	0.8	1.3	1.0

B. *Pseudoefedrina clorhidrato*

B1. Miligramos recuperados de pseudoefedrina clorhidrato en cada nivel

Nivel (%)	mg adicionados	mg recuperados
60.0	0.90	0.90
60.0	0.90	0.90
60.0	0.90	0.92
100.0	1.50	1.49
100.0	1.50	1.51
100.0	1.50	1.54
140.0	2.10	2.09
140.0	2.10	2.12
140.0	2.10	2.16

B2. Ecuación de la recta

$$Y = 1.0122 X - 0.0036$$

$$r^2 = 0.9980$$

B3. Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada del origen y la pendiente

- Ordenada al origen

Límite superior = 0.0601

Límite inferior = -0.0675

- Pendiente

Límite superior = 1.053

Límite inferior = 0.9718

B4. Porcentaje recuperado de pseudoefedrina clorhidrato en cada nivel

Réplica	Porcentaje recuperado			Global
	60 %	100 %	140 %	
1	99.8	99.2	99.4	
2	100.5	100.5	101.1	
3	102.7	102.7	102.9	
n =	3	3	3	9
D. E. =	1.480	1.791	1.710	1.451
Promedio =	101.0	100.8	101.1	101.0
C.V. (%) =	1.5	1.8	1.7	1.4

C. Clorfeniramina maleato

C1. Miligramos recuperados de clorfeniramina maleato en cada nivel

Nivel (%)	mg adicionados	mg recuperados
60.0	0.060	0.059
60.0	0.060	0.060
60.0	0.060	0.060
100.0	0.100	0.099
100.0	0.100	0.099
100.0	0.100	0.100
140.0	0.140	0.138
140.0	0.140	0.140
140.0	0.140	0.141

C2. Ecuación de la recta

$$Y = 0.9977 X - 0.00007$$

$$r^2 = 0.9993$$

C3. Intervalo de confianza al 95 % para la ordenada del origen y la pendiente

- Ordenada al origen

$$\text{Límite superior} = 0.0024$$

$$\text{Límite inferior} = -0.0025$$

- Pendiente

$$\text{Límite superior} = 1.0212$$

$$\text{Límite inferior} = 0.9741$$

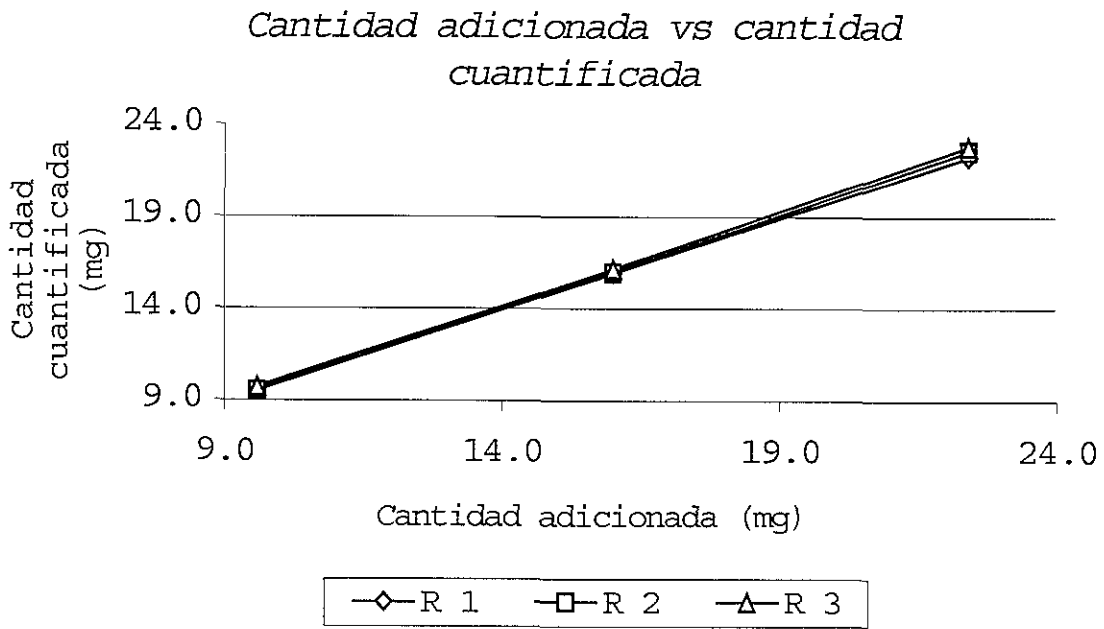
C4. Porcentaje recuperado de clorfeniramina maleato en cada nivel

Réplica	Porcentaje recuperado			Global
	60 %	100 %	140 %	
1	98.6	99.2	98.8	
2	100.6	98.9	99.8	
3	100.7	99.8	101.0	
n =	3	3	3	9
D. E. =	1.189	0.442	1.080	0.889
Promedio =	100.0	99.3	99.9	99.7
C.V. (%) =	1.2	0.4	1.1	0.9

A. Acetaminofén

$$Y = 1.013160 X - 0.149761$$

$$r^2 = 0.999089$$



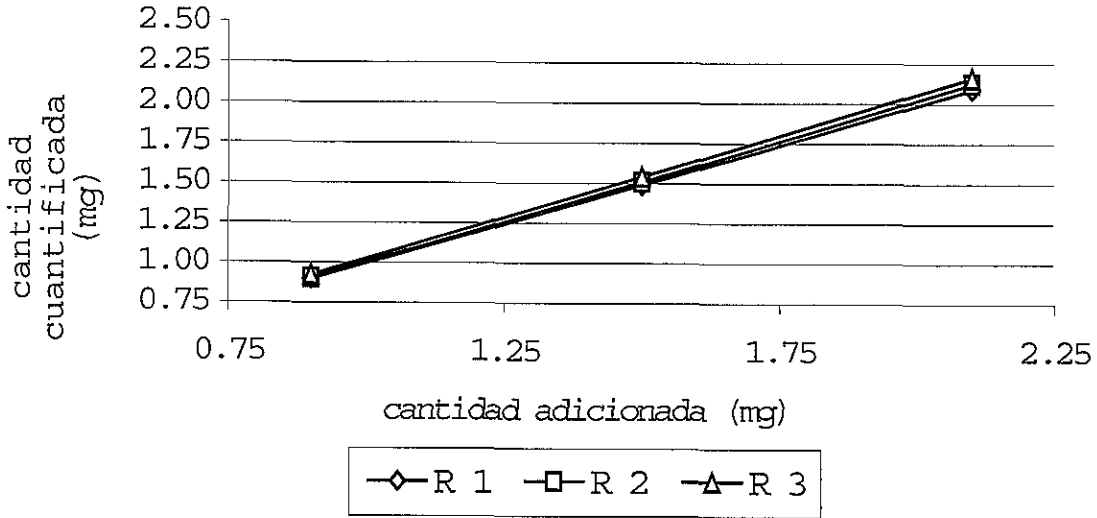
R = Réplica

FIGURA 18
GRAFICA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

B. Pseudoefedrina clorhidrato

$$Y = 1.012282 X - 0.003694$$
$$r^2 = 0.998007$$

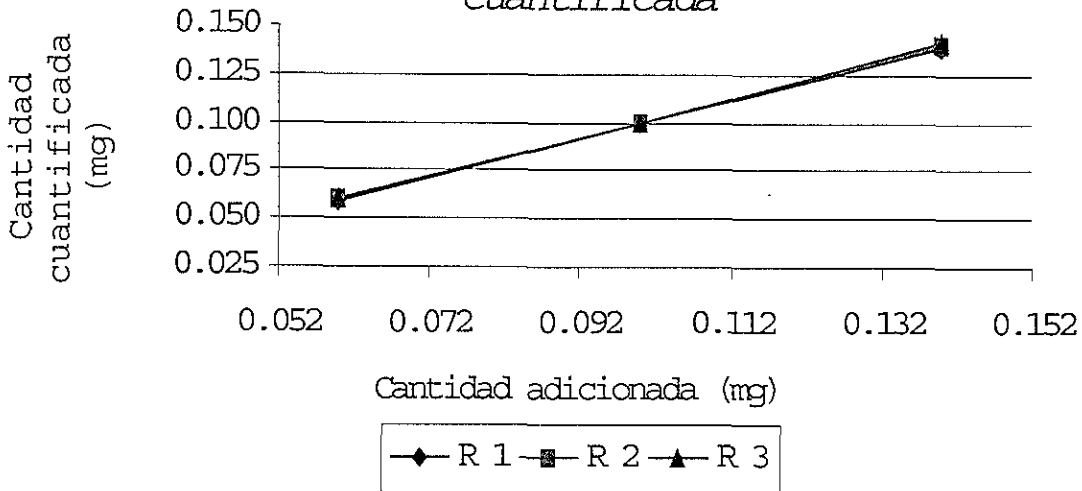
Cantidad adicionada vs cantidad
cuantificada



C. Clorfeniramina maleato

$$Y = 0.997712 X - 0.000078$$
$$r^2 = 0.999301$$

Cantidad adicionada vs cantidad
cuantificada



R = Réplica

FIGURA 18
GRAFICAS DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

VII-2.5 Exactitud del método

En la *Tabla 8* se muestran los porcentajes recuperados para cada uno de los compuestos de interés.

El método es exacto, ya que se cumple con los criterios de aceptación establecidos; teniendo que, para los tres compuestos analizados, el promedio del porcentaje recuperado de las 6 muestras y su intervalo de confianza al 95 %, se encuentran entre el 98.0 y 102.0 %.

TABLA 8
Exactitud y Repetibilidad

A. Acetaminofén

A1. Porcentaje recuperado de acetaminofén al nivel del 100 %

Réplica	Porcentaje recuperado
1	100.9
2	100.5
3	102.7
4	100.5
5	100.9
6	99.9
n = 6	
D. E. = 0.948	
Promedio = 100.9	
C.V. (%) = 0.9	

A2. Intervalo de confianza al 95 % para el porcentaje recuperado al nivel del 100 %

Límite superior = 101.7

Límite inferior = 100.2

B. Pseudoefedrina clorhidrato

B1. Porcentaje recuperado de pseudoefedrina clorhidrato al nivel del 100 %

Réplica	Porcentaje recuperado
1	99.5
2	101.1
3	102.8
4	101.2
5	99.8
6	99.8
n = 6	
D. E. = 1.230	
Promedio = 100.7	
C.V. (%) = 1.2	

B2. Intervalo de confianza al 95 % para el porcentaje recuperado al nivel del 100 %

Límite superior = 101.7

Límite inferior = 99.7

C. Clorfeniramina maleato

C1. Porcentaje recuperado de clorfeniramina maleato al nivel del 100 %

Réplica	Porcentaje recuperado
1	99.3
2	98.4
3	100.3
4	99.0
5	98.9
6	98.2

n = 6
D. E. = 0.731
Promedio = 99.0
C.V. (%) = 0.7

C2. Intervalo de confianza al 95 % para el porcentaje recuperado al nivel del 100 %

Límite superior = 99.6

Límite inferior = 98.4

VII-2.6 Precisión del método

Debido a que se cumple con los criterios de aceptación establecidos, el método resultó ser preciso y reproducible entre analistas y entre diferentes días, según lo siguiente:

VII-2.6.1 Repetibilidad

Para los tres compuestos de interés, el coeficiente de variación del porcentaje recuperado de las seis réplicas analizadas de placebos cargados, es menor que 2.0 % (Ver *Tabla 8*).

VII-2.6.2 Precisión intermedia

En la *Tabla 9* se muestran los porcentajes cuantificados en los dos días de análisis por los dos analistas, así como el promedio global.

Para los tres compuestos de interés, el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado para cada día de análisis y el global no es mayor que 2.0 %.

TABLA 9
Precisión intermedia

A. Acetaminofén

Analista	Réplica	Porcentaje cuantificado		Estadísticos
		Día 1	Día 2	
1	R 1	97.5	98.1	n = 6 D.E. = 0.478 Promedio = 97.6 C.V. (%) = 0.5
	R 2	96.8	97.5	
	R 3	98.1	97.6	
2	R 1	97.6	97.2	n = 6 D.E. = 0.193 Promedio = 97.5 C.V. (%) = 0.2
	R 2	97.7	97.4	
	R 3	97.6	97.5	
Estadísticos				
	n =	6	6	
	D.E. =	0.415	0.316	
	Promedio =	97.6	97.6	
	C.V. (%) =	0.4	0.3	

Resultados globales

n = 12	Promedio = 97.6
D.E. = 0.352	C.V. (%) = 0.4

R = Réplica

B. Pseudoefedrina clorhidrato

Analista	Réplica	Porcentaje cuantificado		Estadísticos
		Día 1	Día 2	
1	R 1	97.5	98.1	n = 6 D.E. = 0.668 Promedio = 97.3 C.V. (%) = 0.7
	R 2	96.8	97.5	
	R 3	98.1	97.6	
2	R 1	97.6	97.2	n = 6 D.E. = 0.441 Promedio = 97.6 C.V. (%) = 0.5
	R 2	97.7	97.4	
	R 3	97.6	97.5	
Estadísticos				
	n =	6	6	
	D.E. =	0.524	0.323	
	Promedio =	97.1	97.8	
	C.V. (%) =	0.5	0.3	

Resultados globales

n = 12	Promedio = 97.5
D.E. = 0.563	C.V. (%) = 0.6

R = Réplica

C. Clorfeniramina maleato

Analista	Réplica	Porcentaje cuantificado		Estadísticos
		Día 1	Día 2	
1	R 1	97.5	98.1	n = 6 D.E. = 1.384 Promedio = 96.8 C.V. (%) = 1.4
	R 2	96.8	97.5	
	R 3	98.1	97.6	
2	R 1	97.6	97.2	n = 6 D.E. = 0.995 Promedio = 97.0 C.V. (%) = 1.0
	R 2	97.7	97.4	
	R 3	97.6	97.5	
Estadísticos				
	n =	6	6	
	D.E. =	0.906	0.501	
	Promedio =	96.0	97.8	
	C.V. (%) =	0.9	0.5	

Resultados globales

n = 12	Promedio = 96.9
D.E. = 1.158	C.V. (%) = 1.2

R = Réplica

VII-2.7 Intervalo

El método es lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones de 0.384 a 0.896 mg/mL para acetaminofén, 0.0024 a 0.0056 mg/mL para clorfeniramina maleato y de 0.036 a 0.084 mg/mL para pseudoefedrina clorhidrato, correspondientes al 60 y 140 % respectivamente.

VII-2.8 Robustez

VII-2.8.1 Estabilidad de la muestra

En la *Tabla 10* se muestran los promedios de los porcentajes cuantificados de las muestras almacenadas a temperatura ambiente en condiciones normales de luz y oscuridad a las 0, 24, 48 y 72 horas.

Para los tres compuestos de interés, se cumplió el criterio de aceptación en cada día de evaluación, teniendo que: la diferencia relativa de los promedios de los porcentajes cuantificados a las 24, 48 y 72 horas respecto al tiempo cero, no es mayor que 2.0 %.

Por lo anterior se concluye que las muestras de solución pediátrica de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato una vez procesadas de acuerdo al método analítico propuesto y almacenadas a temperatura ambiente en condiciones normales de luz y oscuridad, son estables hasta 72 horas.

TABLA 10
Estabilidad de la muestra

A. Acetaminofén

Porcentaje cuantificado promedio

Tiempo cero (t_0)	24 h	48 h	72 h
97.5	97.2	98.1	98.3
Diferencia relativa respecto a t_0	0.3	0.7	0.9

B. Pseudoefedrina clorhidrato

Porcentaje cuantificado promedio

Tiempo cero (t_0)	24 h	48 h	72 h
96.8	97.8	96.3	98.1
Diferencia relativa respecto a t_0	1.0	0.5	1.4

C. Clorfeniramina maleato

Porcentaje cuantificado promedio

Tiempo cero (t_0)	24 h	48 h	72 h
95.8	96.7	95.6	94.0
Diferencia relativa respecto a t_0	1.0	0.2	1.9

VII-2.8.2 Tolerancia del sistema

En la *Tabla 11* se muestran los promedios de los porcentajes cuantificados para cada una de las condiciones de cambio efectuadas en el sistema. Se presentan 2 resultados para las condiciones iniciales; debido a que, el análisis para la evaluación de la condición 3 (cambio de reactivo) se llevó a cabo tiempo después que el análisis para la evaluación de las condiciones 1 y 2 (cambio de columna y cambio de equipo cromatográfico respectivamente), analizando así, la condición 3 respecto a la condición inicial evaluada ese mismo día.

En la *Tabla 11*, también se muestran los parámetros cromatográficos promedio obtenidos de la adecuación del sistema en cada una de las condiciones de cambio efectuadas en el sistema.

El método resultó ser tolerante a cada una de las condiciones probadas: cambio de columna, cambio de equipo cromatográfico y cambio del grado de pureza del heptanosulfonato de sodio con el que se prepara la fase móvil, debido a que se cumplió con los criterios de aceptación planteados para esta prueba, teniendo que:

La diferencia relativa del promedio del porcentaje cuantificado obtenido de las tres muestras analizadas con cada una de las condiciones, respecto al promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras analizadas con las condiciones originales no es mayor que 2.0 %.

Las muestras degradadas y los excipientes de la formulación presentan señales cromatográficas que no interfieren con la cuantificación de los compuestos de interés

En las muestras degradadas, las señales cromatográficas de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato son puras.

De acuerdo a los parámetros cromatográficos encontrados, el sistema es adecuado si:

- El acetaminofén tiene un factor de capacidad (k') entre 0.6 y 1.4 y un coeio (T) entre 1.1 y 1.3
- La pseudoefedrina clorhidrato tiene un factor de capacidad (k') entre 11.3 y 12.2 y un coeio (T) entre 1.0 y 1.1
- La clorfeniramina maleato tiene un factor de capacidad (k') entre 27.2 y 27.5 y un coeio (T) entre 1.1 y 1.3

TABLA 11
Tolerancia del sistema

A. Acetaminofén

Promedios de los porcentajes cuantificados para cada una de las condiciones de cambio

Condición de cambio	Porcentaje cuantificado	Diferencia relativa (%)
Inicial	97.3	-----
1	97.5	0.1
2	97.4	0.1
Inicial	97.4	-----
3	97.2	0.3

Parámetros cromatográficos promedio, obtenidos de la adecuación del sistema en cada una de las condiciones de cambio

Condición de cambio	Parámetro cromatográfico:		
	K'	T	N (platos teóricos)
Inicial	0.6	1.1	3177
1	0.6	1.2	3510
2	1.4	1.1	3553
Inicial	0.6	1.3	2711
3	0.6	1.2	3365

B. Pseudoefedrina clorhidrato

Promedios de los porcentajes cuantificados para cada una de las condiciones de cambio

Condición de cambio	Porcentaje cuantificado	Diferencia relativa (%)
Inicial	97.2	-----
1	96.0	1.2
2	97.1	0.1
Inicial	96.9	-----
3	97.6	1.1

Parámetros cromatográficos promedio, obtenidos de la adecuación del sistema en cada una de las condiciones de cambio

Condición de cambio	Parámetro cromatográfico:		
	K'	T	N (platos teóricos)
Inicial	11.6	1.0	20982
1	11.5	1.0	22149
2	11.3	1.0	21926
Inicial	11.6	1.0	21885
3	12.2	1.1	25974

C. Clorfeniramina maleato

Promedios de los porcentajes cuantificados para cada una de las condiciones de cambio

Condición de cambio	Porcentaje cuantificado	Diferencia relativa (%)
Inicial	95.7	-----
1	95.7	0.0
2	94.7	1.1
Inicial	96.1	-----
3	96.5	0.5

Parámetros cromatográficos promedio, obtenidos de la adecuación del sistema en cada una de las condiciones de cambio

Condición de cambio	Parámetro cromatográfico:		
	K'	T	N (platos teóricos)
Inicial	27.5	1.1	210245
1	27.5	1.1	215756
2	27.2	1.0	216870
Inicial	27.4	1.1	218622
3	27.5	1.1	211885

TABLA 12

Resumen de la validación del método analítico

★ = Cumple con el criterio de aceptación

A = acetaminofén, P = pseudoefedrina clorhidrato, C = clorfeniramina maleato

Parámetro de validación		Criterios de aceptación			Conclusión
		A	P	C	
Especificidad	A excipientes	★	★	★	El método analítico es específico en presencia de excipientes.
	A productos de degradación		★	★	El método analítico es específico en presencia de productos de degradación.
Linealidad del sistema		★	★	★	El sistema es lineal.
Precisión del sistema		★	★	★	El sistema es preciso.
Linealidad del método		★	★	★	El método analítico es lineal.

Exactitud del método	El promedio del porcentaje recuperado debe encontrarse entre 98.0 y 102.0 %.	★	★	★	El método analítico es exacto.
	Repetibilidad	El coeficiente de variación debe ser menor o igual que 2.0 %.	★	★	El método analítico es preciso.
Precisión del método	Precisión intermedia	El coeficiente de variación del porcentaje cuantificado, para cada día de análisis y el global no debe ser mayor que 2.0 %.	★	★	El método analítico es reproducible entre analistas y días.
	Intervalo	Intervalo de trabajo al cual se demostró que se cumple con los criterios de linealidad, exactitud y precisión.	★	★	Del 60 al 140 %
Robustez	Estabilidad de la muestra	La diferencia relativa de los promedios del porcentaje cuantificado a las 24, 48 y 72 horas respecto al tiempo cero, no debe ser mayor que 2.0 %.	★	★	Las muestras, una vez procesadas, son estables hasta 72 horas.
	Tolerancia del sistema	La diferencia relativa del promedio del porcentaje cuantificado obtenido de las tres réplicas de la muestra, analizadas en cada una de las condiciones, respecto al promedio del porcentaje cuantificado de las tres réplicas de la muestra analizadas con las condiciones iniciales, no debe ser mayor que 2.0 %. Las muestras de placebo y las muestras de formulación degradadas por oxidación, hidrólisis ácida y básica, no deben presentar señal alguna que interfiriera con los compuestos de interés. En el análisis espectral, las señales cromatográficas de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato deben ser puras.	★	★	El método analítico es robusto.

VIII. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico por CLAR sencillo, rápido, efectivo, confiable, específico e indicador de estabilidad; capaz de cuantificar simultáneamente: acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato en solución pediátrica.

Al demostrar la efectividad, confiabilidad y la especificidad del método analítico por medio de su validación se encontró que:

- ◆ El sistema es lineal y preciso en el intervalo de 60 a 140 % de la concentración establecida (0.384 a 0.896 mg/mL para acetaminofén, 0.0024 a 0.0056 mg/mL para clorfeniramina maleato y de 0.036 a 0.084 mg/mL para pseudoefedrina clorhidrato).
- ◆ El método analítico es lineal en el intervalo de 60 a 140 % de la concentración establecida (0.384 a 0.896 mg/mL para acetaminofén, 0.0024 a 0.0056 mg/mL para clorfeniramina maleato y de 0.036 a 0.084 mg/mL para pseudoefedrina clorhidrato).
- ◆ El método analítico es exacto, preciso y reproducible entre analistas y días.
- ◆ El método analítico es específico en presencia de excipientes y de productos de degradación.

- ◆ El método analítico es robusto a cambios de columna de diferente eficiencia pero del mismo tipo, a cambios de equipo cromatográfico y a cambios en el grado de pureza del heptanosulfonato de sodio con el que se prepara la fase móvil.
- ◆ Las muestras de la solución pediátrica de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato, una vez procesadas de acuerdo al método analítico propuesto y almacenadas a temperatura ambiente en condiciones normales de luz y oscuridad, son estables hasta 72 horas.
- ◆ El método es adecuado para la cuantificación de acetaminofén, pseudoefedrina clorhidrato y clorfeniramina maleato durante el control de la fabricación del producto y en estudios de estabilidad.

IX. RECOMENDACIONES

Al realizar el primer análisis en un equipo en el que no se haya empleado el método analítico en cuestión, se recomienda lavar y acondicionar el sistema cromatográfico por lo menos durante 12 horas.

Antes de empezar un análisis en un mismo equipo, se recomienda realizar cuando menos 8 inyecciones de la solución de referencia o de la formulación para el acondicionamiento del sistema cromatográfico.

Para obtener resultados exactos y precisos, es necesario asegurar la integración de los picos utilizando el nivel de ruido apropiado para cada compuesto de interés.

Se recomienda revisar constantemente y lavar si es necesario, los filtros de las mangueras de toma de la fase móvil, ya que los componentes de la fase móvil facilitan el crecimiento de hongos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Florey K, compilador. Analytical profiles of drug substances. USA: Academic Press, Inc.; 1974: vol. 3: 1-109.
2. Department of pharmaceutical sciences of the pharmaceutical society of Great Britain. Clarke's isolation and identification of drugs. 2ª ed. Great Britain: The pharmaceutical press, 1986.
3. Reynolds J, compilador. Martindale The extra pharmacopoeia. 29ª ed. Great Britain: Royal pharmaceutical society of Great Britain, 1989.
4. Budavari S. The merck index. 11ª ed. USA: Merck & Co. Inc., 1989.
5. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª ed. México: Secretaría de Salud, 2000.
6. The United States Pharmacopoeia. 24ª ed. USA: United States Pharmacopoeial Convention, Inc., 1999.
7. Florey K, compilador. Analytical profiles of drug substances. USA: Academic Press, Inc., 1985: vol. 14: 551-596.
8. Goodman A. Rall T. Nies A. Taylor P, compiladores. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 8ª ed. USA. McGraw-Hill, Inc., 1993.
9. Diccionario de especialidades farmacéuticas. 46ª ed. México: Ediciones PLM, S.A. de C.V., 2000.
10. Florey K, compilador. Analytical profiles of drug substances. USA: Academic Press, Inc., 1979: vol. 8: 489-507.
11. Florey K, compilador. Analytical profiles of drug substances. USA: Academic Press, Inc., 1980: vol. 7: 43-79.

12. Snyder L. Glajch J. Kirkland J, Practical HPLC methods development. USA: John Wiley and sons, Inc., 1988.
13. Jonsson J. Chromatographic theory and basic principles. USA: Marcel Dekker, Inc., 1987: vol. 38.
14. Perkin-Elmer Corp. Curso de introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. México: Perkin-Elmer de México, S.A.
15. Yost R. Ettre L. Conlon D, Introducción a la cromatografía líquida práctica. USA: Perkin-Elmer Corp., 1981.
16. Hearn M. Ion-pair chromatography. USA: Marcel Dekker, Inc., 1985: vol. 31.
17. Snyder L. Kirkland J, Introduction to modern liquid chromatography. 2ª ed. USA: John Wiley and sons, Inc., 1979.
18. Fong W. Lam S, HPLC in the pharmaceutical industry. USA: Marcel Dekker, Inc., 1991: vol. 47.
19. Pryde A. Gilbert M, Applications of high performance liquid chromatography. USA: John Wiley and sons, Inc., 1979.
20. Parris N. Instrumental liquid chromatography, Journal of chromatography library. 2a ed. Netherlands: Elsevier science publishers B.V., 1984: vol. 27.
21. Engelhardt H. Practice of high performance liquid chromatography. Germany: Springer-Verlag, 1986.
22. Vickrey T. Liquid chromatography detectors. USA: Marcel Dekker, Inc., 1983.
23. Chromatography columns and supplies catalog. USA: Waters Corp., 1999.
24. Quattrocchi O. Abelaira S. Laba R, Introducción a HPLC aplicación y práctica. Argentina: Artes Gráficas Farro S.A., 1992.

25. Comité de elaboración de guías oficiales de validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Guía de validación de métodos analíticos. México: Secretaría de Salud.
26. Taylor J. Validation of analytical methods. *Analytical Chemistry* 1983; 55:(6).
27. Guidance for industry, Q2B validation of analytical procedures: Methodology. ICH, 1996.
28. Guidance for industry, text on validation of analytical procedures (ICH Q2A). ICH, 1995.
29. Guidance for industry, analytical procedures and methods validation: Chemistry, manufacturing, and controls documentation. DRAFT GUIDANCE. FDA, 2000.
30. NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. México: Secretaría de salud, Diario oficial, 1998.
31. NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. México: Secretaría de salud, Diario oficial, 1999.