

00524  
120

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO, OPTIMIZACION Y VALIDACION DE UN  
METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE UN  
ANALGESICO Y UN REBEFACIENTE EN UN GEL, POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION  
(HPLC).

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
E R I K A N A V A P E R E Z



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DRA. HELGI HELEN JUNG COOK**

**VOCAL: PROF. SOFIA MARGARITA RODRÍGUEZ ALVARADO**

**SECRETARIO: M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ**

**1er. SUPLENTE: PROF: RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ**

**2do. SUPLENTE: PROF. LUIS JESUS GARCÍA AGUIRRE**

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA**

**LABORATORIO 113 BIOFARMACIA  
EDIFICIO E  
FACULTAD DE QUIMICA**

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR DEL TEMA: M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ**

  
\_\_\_\_\_  
**SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. JOSÉ MANUEL MORALES H.**

  
\_\_\_\_\_  
**SUSTENTANTE: ERIKA NAVA PEREZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Facultad de Química:**

*Por haber sido mi casa durante 5 años y donde me forme profesionalmente.*

**A mis profesores:**

*Por ser formadores y darnos el conocimiento para desarrollamos profesionalmente.*

**Al M. en C. Manuel Rodríguez:**

*Por la oportunidad y apoyo para la realización de este proyecto.*

**Al M. en C. Manuel Morales H.**

*Por los conocimientos compartidos, el apoyo en la realización de este proyecto y por la amistad que me has brindado.*

*Gracias.*

## **DEDICO ESTE LOGRO:**

### **A Dios:**

*Por permitirme existir y tener una vida plena.*

### **A mis Padres:**

*Por ser los instrumentos que han guiado mi camino y han hecho de mí una persona feliz, por apoyarme en cada decisión que he tomado e impulsarme en los momentos buenos y en los difíciles a alcanzar mis propósitos, así como dame la libertad de elegir mi camino y forma de vida.*

*Porque incondicionalmente siempre están con nosotras.  
Gracias por su tiempo, dedicación, confianza y amor.*

### **A Cay, Kamis y Karlo:**

*Por ser parte fundamental en mi vida y compartir tantos momentos maravillosos, por su amistad y cariño. Las amo.*

### **A Leo:**

*Por ser mi amigo y compañero que me impulsa a seguir adelante y a luchar por alcanzar mis metas.  
Por contar siempre contigo y por la alegría de compartir nuestras vidas. Te amo.*

### **A ti pequeñuelo:**

*Que llegaras a iluminar nuestras vidas.*

### **A mis amigos, Dey, Iván y Ale:**

*Por su gran amistad la cual es un tesoro maravilloso, que en muchos momentos fue mi fortaleza y ganas de seguir adelante. Gracias " equipo" por todos esos alegres momentos.*

4

## INDICE

### CAPITULO I

#### INTRODUCCION

Introducción  
Objetivo

PAGINA  
2  
2

### CAPITULO II

#### GENERALIDADES

1.1	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	4
1.2	Selección del tipo de cromatografía en el desarrollo de métodos analíticos	5
1.3	Cromatografía de fase inversa. (reversa)	6
1.4	Cromatografía de pares de iones	7
1.5	Términos Cromatograficos	8
1.6	Validación	11
1.6.1	Parámetros de validación para métodos de HPLC para productos farmacéuticos y sustancias activas.	12
1.7	Métodos generales para la determinación de Salicilato de metilo y bencidamina.	16
1.8	Métodos Analíticos	18
1.9	Diseño y análisis de Experimentos	21

### CAPITULO III

#### PARTE EXPERIMENTAL

2.1	Selección de los factores que modifican la respuesta analítica y planteamiento del diseño experimental.	24
2.2	Evaluación del efecto de la proporción de ácido acético en la fase móvil.	26
2.3	Validación	27
2.3.1.	Selectividad	27
2.3.2	Curva de calibración sin excipientes (linealidad del sistema)	27
2.3.3	Curva de calibración con excipientes (linealidad del método)	28
2.3.4.	Reproducibilidad	30
2.3.5.	Exactitud	30
2.3.6.	Precisión del sistema	30
2.3.7.	Tolerancia del método	31
2.3.8.	Estabilidad de la solución de las muestras y la referencia	31
2.3.9.	Estabilidad de la fase móvil	34
2.3.10	Límite de detección.	34
2.3.11	Límite de cuantificación	34

### CAPITULO IV

#### RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

3.1	Resultados del diseño experimental:	37
3.1.1.	Resultados para Rs1 (resolución entre el pico de bencidamina y Salicilato de metilo)	37
3.1.2.	Resultados para Rs2 (resolución entre Salicilato de metilo y el estándar interno)	40
3.1.3.	Resultados para T (coleo):	43
3.1.4.	Resultados para la respuesta Tr (tiempo de retención de bencidamina)	46

5

3.1.5.	Discusión final del diseño experimental	48
3.2.	Resultados de la evaluación del efecto de la proporción de ácido acético en la fase móvil	49
3.3.	Condiciones finales	50
3.4.	Validación	51
3.4.1.	Selectividad	51
3.4.2.	Linealidad del Sistema	54
3.4.3.	Precisión del sistema	55
3.4.4.	Linealidad del método	56
3.4.5.	Reproducibilidad	58
3.4.6.	Exactitud del método	60
3.4.7.	Tolerancia del método	61
3.4.8.	Estabilidad de la solución de la muestra y de referencia	63
3.4.9.	Estabilidad de la muestra en la fase móvil	65
3.4.10.	Límite de detección	65
3.4.11.	Límite de cuantificación	66
3.5.	Resultado final de la validación del método analítico	66

**CAPITULO V  
CONCLUSIONES**

4	Conclusiones	69
---	--------------	----

**CAPITULO VI**

**APENDICES**

5	APENDICE I. PRINCIPIOS ACTIVOS	71
	APENDICE II. REACTIVOS, EQUIPO Y PREPARACION DE SOLUCIONES	73
	APENDICE III. CROMATOGRAMAS	75

**CAPITULO VII  
BIBLIOGRAFIA**

6	BIBLIOGRAFIA	83
---	--------------	----

**LISTADO DE TABLAS**

TABLA	NOMBRE	PAGINA
Tabla 1	Parámetros de fuerza del disolvente, $\epsilon^0$ , y propiedades físicas de Disolventes seleccionados.	7
Tabla 2	Niveles y factores del diseño experimental.	25
Tabla 3	Diseño experimental.	25
Tabla 4	Diseño experimental para la evaluación de la cantidad de ácido acético en la Fase móvil	26
Tabla 5	Preparación de muestras y condiciones para la degradación de los activos.	27
Tabla 6	Linealidad del Sistema. Preparación de Soluciones.	28
Tabla 7	Linealidad del Método. Preparación de Soluciones.	28
Tabla 8	Cambios en la proporción de solventes en la fase móvil, para la evaluación de la tolerancia del método.	31
Tabla 9	Resultados del Diseño experimental.	37
Tabla 10	Efectos estimados para Rs1	37
Tabla 11	Análisis de varianza para Rs1	38
Tabla 12	Coefficientes de regresión para Rs1	39

6

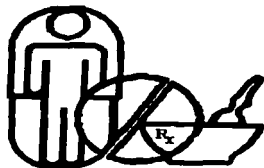
Tabla 13	Proyecciones para Rs1	39
Tabla 14	Condiciones óptimas para Rs1	40
Tabla 15	Efectos estimados para Rs2.	41
Tabla 16	Análisis de varianza para Rs2.	41
Tabla 17	Coefficientes de regresión para Rs2	41
Tabla 18	Proyecciones para Rs2.	42
Tabla 19	Condiciones óptimas para Rs2	43
Tabla 20	Efectos estimados para la respuesta de Coleo (T)	43
Tabla 21	Análisis de varianza para T (Coleo del pico de Bendidamina).	44
Tabla 22	Coefficientes de regresión para T	44
Tabla 23	Proyecciones para T.	45
Tabla 24	Condiciones óptimas para T.	45
Tabla 25	Efectos estimados para la respuesta de Coleo (Tr)	46
Tabla 26	Análisis de varianza para Tr	46
Tabla 27	Coefficientes de regresión para Tr	47
Tabla 28	Comparativo de las Respuesta Analíticas	48
Tabla 29	Resultados de la evaluación de la proporción de ácido acético en al fase móvil.	49
Tabla 30	Análisis estadístico para la Linealidad del sistema.	54
Tabla 31	Resultados de la evaluación de precisión del sistema.	56
Tabla 32	Relación de áreas para la reproducibilidad (día 1)	56
Tabla 33	Relación de áreas para la reproducibilidad (día 2)	58
Tabla 34	Resultado global de la reproducibilidad.	59
Tabla 35	Análisis estadístico para la Linealidad del Método	60
Tabla 36	Cantidad recuperada de Analgésico	61
Tabla 37	Cantidad recuperada de Salicilato de Metilo	61
Tabla 38	Parámetros cromatográficos obtenidos con la fase móvil al 36%.	62
Tabla 39	Parámetros cromatográficos obtenidos con la fase móvil al 40%.	62
Tabla 40	Parámetros cromatográficos obtenidos con la fase móvil al 44%.	62
Tabla 41	Estabilidad de la solución de la muestra de Bendidamina.	63
Tabla 42	Estabilidad de la solución de referencia para Analgésico	63
Tabla 43	Estabilidad de la solución de la muestra de Salicilato de metilo	64
Tabla 44	Estabilidad de la solución de referencia para Salicilato de metilo.	64
Tabla 45	Estabilidad de a fase móvil.	65
Tabla 46	Condiciones cromatográficas de los tres métodos	66
Tabla 47	Comparativo de las respuestas de los tres métodos	67

### LISTADO DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PAGINA
Fig. 1	Ilustración esquemática de la separación de dos componentes (A y B).	4
Fig. 2	Tipos de Cromatografía.	5
Fig. 3	Esquema de la Resolución.	9
Fig. 4	Esquema del factor de coleo.	10
Fig. 5	Estructura del proceso de validación.	11
Fig. 6	Proceso Analítico	19
Fig. 7	El procedimiento analítico como una caja negra.	20
Fig. 8	Estructura del procedimiento analítico.	21
Fig. 9	Esquema del tratamiento de la muestra en la Linealidad del Método.	29
Fig. 10	Esquema del procedimiento de estabilidad de la solución de la muestra.	32
Fig. 11	Esquema del procedimiento de estabilidad de la solución de referencia.	33
Fig. 12	Gráfica de cubo para Rs1.	40



Fig. 13	Gráfica de cubo para Rs2.	43
Fig. 14	Gráfica de cubo para T.	45
Fig. 15	Gráfica de cubo para Tr.	47
Fig. 16	Cromatograma de la fase móvil utilizada en el método.	51
Fig. 17	Cromatograma de la solución de referencia, la cual contiene Bencidamina (Tr= 2.645 min), Salicilato de metilo (Tr= 4.209 min) e Indometacina (Tr= 6.432 min).	51
Fig. 18	Cromatograma de la muestra Blanco de NaOH, se presentan dos señales ( Tr= 1.068 min y 1.307 min) que corresponden a la NaOH.	51
Fig. 19	Cromatograma de la muestra Blanco de HCl, Se presenta una señal (Tr= 1.100 min) la cual corresponde al HCl.	52
Fig. 20	Cromatograma de la muestra Blanco de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , se presenta una señal (Tr=1.151 min) la cual corresponde al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	52
Fig. 21	Cromatograma de la muestra Placebo en medio básico (NaOH)	52
Fig. 22	Cromatograma de la muestra Placebo en medio ácido (HCl)	53
Fig. 23	Cromatograma de la muestra Placebo en medio oxidante (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	53
Fig. 24	Linealidad del Sistema para Bencidamina.	54
Fig. 25	Linealidad del Sistema para Salicilato de Metilo.	55
Fig. 26	Linealidad del Método para Bencidamina.	57
Fig. 27	Linealidad del Método para Salicilato de Metilo.	57
Fig. 28	Exactitud del Método para Bencidamina.	58
Fig. 29	Exactitud del Método para Salicilato de Metilo.	59
Fig. 30	Cromatograma obtenido con el método A	67
Fig. 31	Cromatograma obtenido con el método B	67



**Biofarmacia**

***CAPITULO I  
INTRODUCCION***

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **INTRODUCCION:**

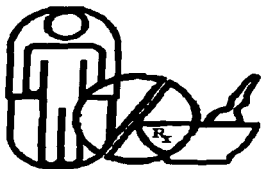
En la actualidad, la calidad de los productos farmacéuticos debe ser asegurada por el fabricante, desde el inicio del proceso de manufactura hasta la aprobación y distribución del mismo. Parte importante de este ciclo es el análisis fisicoquímico del producto, el cual, tiene como base métodos analíticos validados que comprueban que el producto cumple con las especificaciones establecidas y asegura la efectividad del mismo.

La Validación de los métodos analíticos es de gran importancia en todos los laboratorios de análisis ya que con esto se asegura que los resultados analíticos que se obtengan al analizar el producto farmacéutico, son confiables, además de que día con día se esta en la búsqueda de la optimización de estos métodos y la disminución en el costo de los mismos.

Existen diferentes documentos o guías para la validación de métodos analíticos, algunos de estos son: la Guía de Validación de Métodos Analíticos emitido por el Colegio de QFB's y la guía del ICH Topic Q2B Validation of analytical Procedures Methodology, de los cuales se tomaron los lineamientos para la realización del presente trabajo, cuyo objetivo fue desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando la técnica de diseño de experimentos.

## **OBJETIVO:**

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método analítico por CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR), para la determinación de un Analgésico y un Rubefaciente en un gel, con el que se disminuya el coleo que se presenta en la respuesta cromatográfica de Bencidamina, mediante Diseño de Experimentos en la etapa de medición del proceso analítico.



**Biofarmacia**

***CAPITULO II  
GENERALIDADES***

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## GENERALIDADES

1.1. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION <sup>1</sup>

La Cromatografía es un método analítico empleado ampliamente en la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. La cromatografía fue inventada por el británico ruso Mikhail Tswett poco después del inicio del siglo XX. Tswett hizo pasar soluciones que contenían pigmentos vegetales, como clorofilas y xantofilas, a través de columnas de vidrio empacadas con carbonato de calcio dividido finamente. Las especies separadas aparecían como bandas coloridas sobre la columna, lo cual explica el nombre que se escogió para el método (del griego *chroma*, que significa "color", y *graphein*, que significa "describir"). La cromatografía es una técnica en la cual los componentes de una mezcla son separados por base en las velocidades a las cuales son pasados a través de una fase estacionaria por el flujo de una fase móvil gaseosa o líquida (fig. 1)

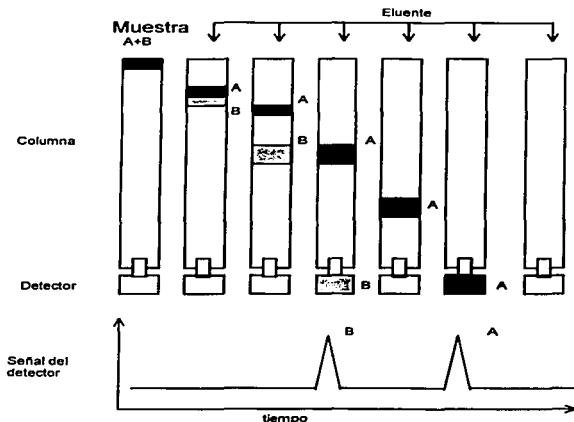


Fig. 1. Ilustración esquemática de la separación de dos componentes (A y B).

## 1.2. SELECCIÓN DEL TIPO DE CRMATOGRAFIA EN EL DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS<sup>2</sup>

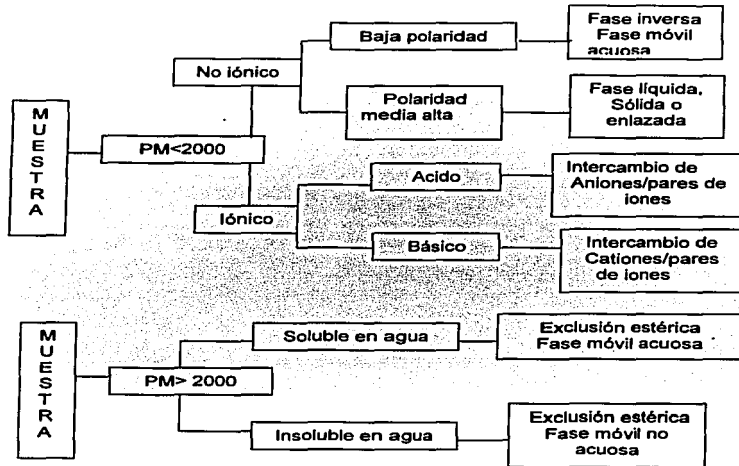


Fig.2. Tipos de Cromatografía.

Si la muestra es insoluble en agua, posee carácter alifático aromático y tiene un peso molecular de menos de 2000 daltons para todos los componentes, las posibilidades son la cromatografía de adsorción (líquido - sólido) o la cromatografía líquido - líquido. La *cromatografía de adsorción* opera mejor en la separación por clases o para la separación de compuestos isoméricos.

La técnica de *cromatografía líquido - líquido* es mejor para la separación de homólogos. Los grupos funcionales que son capaces de formar enlaces hidrógeno fuertes se retienen mucho en cromatografía de adsorción. Sin embargo, la cromatografía líquido - líquido proporciona una alternativa para la separación de estos compuestos. Estas serán las muestras que tienen una polaridad media y son solubles en disolventes orgánicos débilmente polares. En general la separación de no

electrolitos en cromatografía líquido - líquido se logra igualando la polaridad de la fase estacionaria con la de la muestra y utilizando una fase móvil con una polaridad marcadamente diferente.

Los grupos iónicos y los ionizables sugieren el uso de la cromatografía de *intercambio iónico* o de *pares de iones*, cuando la muestra es soluble en agua y los pesos moleculares son menores de 2000 daltons. Cuando se sabe o se sospecha que el peso molecular excede aproximadamente de 2000 daltons para alguno o todos los componentes de la muestra, entonces es indicado el uso de la *cromatografía de exclusión* (permeación en gel). Este método clasifica y separa muestras de mezclas de acuerdo al tamaño y forma molecular.

Un método cromatográfico adicional depende de la estructura de los solutos considerada como un todo y no como función de grupos funcionales específicos o de la carga o el tamaño. La *cromatografía de afinidad* utiliza especies bioquímicas inmovilizadas como fase estacionaria para separar uno o algunos de entre cientos de ellos que no se retienen. Las separaciones explotan el enlace de "cerradura y llave" que prevalece en los sistemas biológicos (fig. 2).

### 1.3. CROMATOGRAFIA DE FASE INVERSA. (REVERSA)<sup>2</sup>

La cromatografía de fase inversa utiliza un empaque enlazado hidrofóbico, usualmente con un grupo funcional octadecilo (C-18) u octilo (C-8) y una fase móvil polar, frecuentemente una fase móvil parcial o totalmente acuosa.

Las sustancias polares prefieren la fase móvil y eluyen primero. Conforme aumenta el carácter hidrofóbico de los solutos, la retención aumenta. Generalmente, a menor polaridad de la fase móvil, mayor es la fuerza del eluyente. Los hidrocarburos son retenidos más fuertemente que los alcoholes.

También la fuerza eluyente de los diversos disolventes en cromatografía de fase inversa sigue el orden dado en la tabla 1, así el agua es el eluyente más débil. El metanol y el acetonitrilo son disolventes populares porque tienen una baja viscosidad y son fáciles de conseguir con excelente pureza. En los eluyentes de fuerza intermedia se obtienen normalmente preparando mezclas entre estos disolventes y el agua.<sup>2</sup>

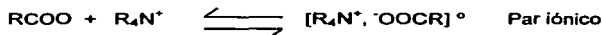
Tabla 1. Parámetros de fuerza de disolvente, y propiedades físicas de disolventes.<sup>2</sup>

DISOLVENTE	$\epsilon^o$ (SiO <sub>2</sub> )	$\epsilon^o$ (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Viscosidad 20°C (mN <sup>2</sup> seg <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	Índice de refracción 20°C
Agua	-----	Grande	1.00	1.333
Metanol	-----	0.95	0.60	1.329
1-propanol	-----	0.82	2.00 (25°C)	1.380
Acetonitrilo	0.50	0.65	0.375	1.344
1-pentanol	-----	0.61	4.1	1.410
Acetato de etilo	0.38	0.58	0.45	1.370
1,4-dioxano	0.49	0.56	1.54	1.422
Acetona	0.47	0.56	0.32	1.359
Tetrahidrofurano	-----	0.45	0.55	1.407
Metil - isobutil cetona	-----	0.43	-----	1.394
Dicloruro de metileno	-----	0.42	0.44	1.425
Cloroformo	-----	0.40	0.57	1.443
Eter dietílico	0.38	0.38	0.23	1.353
Benceno	0.25	0.32	0.65	1.501.
2-cloropropano	-----	0.29	0.335	1.378
Eter di isopropílico	-----	0.28	0.379	1.368
1-clorobutano	-----	0.26	0.47	1.402
Tetracloruro de carbono	0.14	0.18	0.965	1.460
Disulfuro de carbono	0.14	0.15	0.363	1.628
Ciclohexano	-0.05	0.04	0.980	1.426
Hexano	-----	0.00	0.313	1.375
Pentano	0.00	0.00	0.230	1.358

#### 1.4. CROMATOGRAFIA DE PAR IÓNICO.<sup>3</sup>

Puede considerarse un sub-conjunto de la cromatografía de fase inversa, puede tratar con especies ionizadas o ionizables en columnas de fase inversa.

Con este método se pueden trabajar muestras muy polares, ionizadas y/o básica. En este tipo de cromatografía se añade a la fase móvil un reactivo par iónico (un contra-ión orgánico grande) en una concentración muy baja (normalmente de 0.005 M). El reactivo par iónico se encuentra ionizado por sí mismo. El ión del reactivo se retiene en la fase estacionaria cargada por lo que puede retener y separar solutos de iones inorgánicos de carga opuesta, formando complejos de par iónico reversibles con la muestra ionizada (una especie formada por la asociación coulombica entre 2 iones de carga iónica opuesta), el equilibrio es el siguiente:





## 1.5. TÉRMINOS CROMATOGRÁFICOS

### FACTOR DE CAPACIDAD<sup>4,5</sup>

Es un factor cromatográfico que mide el grado de retención de los solutos e indica donde está localizado el pico de interés respecto al volumen muerto. Puede ser calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

donde:

$t_r$  = es el tiempo de retención del pico de la muestra.

$t_0$  = es el tiempo de elución de un compuesto no retenido.

Recomendaciones:

El pico debe presentar una buena resolución respecto a los otros picos y al volumen muerto. Generalmente el valor de  $k'$  es  $>2$ .

### PRECISIÓN/ REPETIBILIDAD DE INYECCIÓN (DER)<sup>4,5</sup>

La precisión de la inyección expresada como la DER (desviación estándar relativa), indica el rendimiento de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), incluyendo la tubería, columna y condiciones ambientales, en el tiempo que la muestra es analizada. Debe recordarse que la preparación de la muestra y variaciones en la manufactura no se consideran.

$$DER = \frac{\text{Desv. Est.} \times 100}{\text{Promedio}}$$

Desv. Est. = Desviación Estándar

Se recomienda obtener una  $DER \leq 1.0\%$  para  $n \geq 5$

### SELECTIVIDAD ( $\alpha$ )<sup>4,5</sup>

Medida de la separación relativa entre dos compuestos adyacentes, la selectividad está dada por el factor de capacidad de los picos adyacentes.

$$\alpha = k'_1 / k'_2$$

Conforme el valor de  $\alpha$  se aproxima a la unidad, la selectividad disminuye.

### RESOLUCIÓN<sup>4,5</sup>

Es la capacidad de la columna para separar los picos cromatográficos. La resolución puede ser calculada de dos maneras:

$$1. \quad R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{w_2 + w_1}{2}} = \frac{2 \Delta T}{w_2 + w_1}$$

donde:

$t_{r2}$  y  $t_{r1}$  = son los tiempos de retención de los componentes retenidos, medido como el máximo del pico  
 $w_2$  y  $w_1$  = ancho de la base del pico  
 $\Delta T$  = es la diferencia entre  $t_{r2}$  y  $t_{r1}$

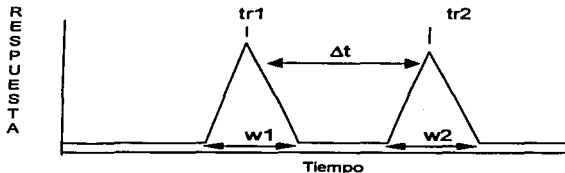


Fig. 3. Esquema de la Resolución.

$$2. \quad R_s = \frac{1}{2} (N)^{1/2} (\alpha - 1) \left( \frac{1}{1+k'} \right)$$

El valor de la resolución depende principalmente de dos factores: ancho del pico y la distancia entre los picos adyacentes (fig. 3.) La eficiencia de la columna y la selectividad afectan la resolución. La eficiencia de la columna esta en función del flujo de la fase móvil, tamaño de partícula del empaque de la columna y la viscosidad del disolvente. La selectividad de la columna es resultado de la interacción del soluto con el disolvente y el empaque de la columna.

#### FACTOR DE COLEO:

El factor de coleo es un fenómeno en el cual el comportamiento Gaussiano normal del pico tiene un factor de simetría  $>1$  (fig. 4.). El coleo es causado por los sitios en el empaque que tienen una retención normal o fuerte por el soluto. Un ejemplo típico de un fenómeno de coleo es la fuerte adsorción de las aminas en los grupos silanoles debido a un pobre recubrimiento o bajo porcentaje de los grupos

funcionales en cromatografía de fase reversa. El coleo causa problemas en la cuantificación del analito ya que no se puede integrar el pico con exactitud.

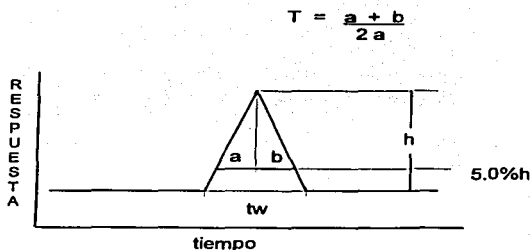


Fig. 4. Esquema del factor de coileo.

**NUMERO DE PLATOS TEORICOS:**

Puede ser calculado según:

$$N = \left( \frac{16}{t_w} \right) t_r^2 = \frac{L}{H}$$

donde:

- tr = es el tiempo de retención
- tw = ancho del pico en la línea base
- L = Longitud de la columna
- H = Altura equivalente a un plato teórico

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna. El valor de N es independiente del tiempo de retención.

**HETP:**

Altura equivalente a un plato teórico, mide la eficiencia de la columna por unidad de longitud (L) de la columna. Se prefiere esta medición ya que permite comparar columnas de diferente longitud.

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

Los parámetros que afectan a N y H incluyen la posición del pico, tamaño de partícula en la columna, velocidad de flujo de la fase móvil, temperatura de la columna, viscosidad de la fase móvil y peso molecular del analito.

## VALIDACION

### 1.6. VALIDACION. <sup>4,5,6</sup>

Los procedimientos de prueba para la evaluación de los niveles de calidad de los productos farmacéuticos están sujetos a varios requisitos. De acuerdo a la sección 501 de la Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, los ensayos y especificaciones en las monografías de la United States Pharmacopoeia (USP) y el National Formulary constituyen estándares legales. El Current Good Manufacturing Practice requiere de métodos de prueba, los cuales son usados para evaluar el cumplimiento de los productos farmacéuticos con las especificaciones establecidas

La selección de un método analítico es el primer paso para establecer una metodología analítica. La validación del método desarrollado implica el demostrar a través de estudios de laboratorio que las características del método cumplen los requerimientos para las aplicaciones analíticas del método.

El proceso de validación de un método analítico puede ser esquematizado de la siguiente forma:

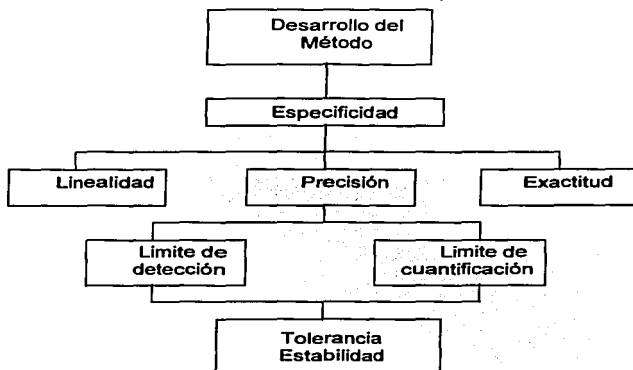


Fig. 5. Estructura del proceso de validación.

### **1.6.1. PARAMETROS DE VALIDACIÓN PARA MÉTODOS DE HPLC PARA PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y SUSTANCIAS ACTIVAS.**

Muchos tipos de cromatografía están disponibles, el más común es la cromatografía de fase reversa con detección UV. El criterio de validación para esta técnica puede ser extrapolada a otros métodos de detección y técnicas cromatográficas.

#### **ESPECIFICIDAD / SELECTIVIDAD:**

Es la capacidad del método analítico de que no se presenten interferencias de otros componentes en la cuantificación del analito. El método deberá discernir entre el compuesto de interés y las posibles interferencias derivadas de productos de degradación y / o excipientes de la fórmula. Para evaluar este parámetro se emplearon muestras de placebo cargado, entendiéndose por placebo aquellas muestras que contienen todos los componentes de la fórmula excepto el principio activo.

#### **LINEALIDAD:**

El rango lineal de detectabilidad que cumple la ley de Beer depende del compuesto analizado y el detector usado. La concentración de la muestra a trabajar y las muestras a evaluar para la exactitud deberán estar en un rango lineal.

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

#### **PRECISIÓN:**

La precisión es la medida de la cercanía de los valores de cada una de las mediciones realizadas a la misma muestra bajo las mismas condiciones analíticas.

La precisión consta de tres componentes: Repetibilidad y reproducibilidad.

1. **Repetibilidad.** La determinación, expresada como la DER, consiste en mediciones múltiples de una muestra por el mismo analista bajo las mismas condiciones analíticas. Para fines prácticos, frecuentemente se combina con la prueba de exactitud y es considerada como un estudio independiente.
2. **Reproducibilidad:** La Reproducibilidad expresa la precisión entre diferentes laboratorios.

#### **EXACTITUD:**

La exactitud es la medida de la cercanía del valor experimental con el valor verdadero. Para evaluar este parámetro se emplearon muestras de placebo cargado,

entendiéndose por placebo aquellas muestras que contienen todos los componentes de la fórmula excepto el principio activo.

### **LIMITE DE DETECCIÓN:**

Existen diferentes métodos para determinar el límite de detección dependiendo si el método es instrumental o no - instrumental.

- a) Basándose en una evaluación visual: El límite de detección se determina por el análisis de muestras de concentraciones conocidas del analito y que puedan ser confiablemente detectadas. Se aplica para ambos tipos de métodos.
- b) Basándose en la señal de ruido: Solo puede aplicarse a métodos analíticos que presenten una línea base. La determinación de la señal de ruido se realiza comparando la medida de la señal de muestras con baja concentración del analito con muestras blanco y estableciendo la mínima concentración a la cual el analito puede ser confiablemente detectado. Una señal de ruido en un radio entre 3 o 2:1 es considerada aceptable para estimar el límite de detección.
- c) Basándose en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente, la cual puede ser estimada a partir de la curva de calibración del analito.
  - Basándose en la Desviación estándar del blanco. Analizando un número adecuado de preparaciones blanco y calculando la desviación estándar de esta respuesta.
  - Basándose en la curva de calibración. Usando muestras que contengan el analito en el rango del límite de detección. La desviación estándar residual de la línea de regresión o la desviación estándar del intercepto de las líneas de regresión puede ser usadas como la desviación estándar.

Si el límite de detección se realiza con una evaluación visual o por la señal del ruido, se requiere presentar un cromatograma para una justificación aceptable.

En los casos donde el límite de detección es calculado por extrapolación, el estimado debe ser validado con un análisis independiente de un número adecuado de muestras con una concentración del analito cercana o igual al límite de detección.

### **LIMITE DE CUANTIFICACIÓN:**

El límite de cuantificación es la concentración más baja de un analito en una muestra que puede ser determinado con una precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales iniciales.

Puede ser determinado dependiendo si el método es instrumental o no instrumental.

- a) **Basándose en una evaluación visual:** El límite de detección es determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito estableciendo el nivel mínimo al cual el analito puede ser cuantificado con exactitud y precisión. Se aplica para ambos tipos de métodos.
- b) **Basándose en la señal de ruido:** Solo puede aplicarse a métodos analíticos que presenten una línea base. La determinación de la señal de ruido se realiza comparando la medida de la señal de muestras con baja concentración del analito con muestras blanco y estableciendo la mínima concentración a la cual el analito puede ser confiablemente cuantificado. Una señal de ruido en un radio 10:1 es considerada aceptable para estimar éste límite.
- c) **Basándose en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente, la cual puede ser estimada a partir de la curva de calibración del analito.**
  - Basándose en la Desviación estándar del blanco. Analizando un número adecuado de preparaciones blanco y calculando la desviación estándar de esta respuesta.
  - Basándose en la curva de calibración. Usando muestras que contengan el analito en el rango del límite de cuantificación. La desviación estándar residual de la línea de regresión o la desviación estándar del intercepto de las líneas de regresión puede ser usadas como la desviación estándar.

El límite deberá ser validado con un análisis independiente de un número adecuado de muestras con una concentración del analito, cercana o igual al límite de cuantificación determinado.

#### **RANGO:**

El rango es el intervalo entre el nivel más alto y el más bajo de concentración del analito bajo estudio, que puede cuantificarse en forma exacta y precisa con el método desarrollado. Generalmente se encuentra implícito en las pruebas de linealidad.

#### **RECUPERACION:**

La recuperación es expresada como la cantidad/peso del compuesto de interés analizado como un porcentaje de la cantidad teórica presente en el medio. La recuperación del compuesto de interés deberá ser total. Durante el procedimiento de preparación de la muestra, el compuesto de interés es recuperado a partir de los excipientes de la formulación (como una solución acuosa simple hasta una formulación compleja en crema) y del contenedor. El resultado se reporta como el porciento recuperado (%).

---

### **TOLERANCIA:**

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación (temperaturas, laboratorios, columnas, lotes de reactivo, equipo, etc.) La tolerancia generalmente se expresa como la carencia de influencia en los resultados por cambios en las condiciones de operación. Es una medida de la reproducibilidad de los resultados analíticos bajo las condiciones normales de operación de laboratorio a laboratorio y de analista a analista.

### **ROBUSTEZ:**

Es la medida de la capacidad que tiene el método de asegurar la obtención de resultados reales, bajo pequeñas variaciones en el método, es decir que no se afecten los parámetros cromatográficos.

Si las respuestas son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, estas deberán ser controladas adecuadamente o indicadas en la técnica, debe asegurarse que las respuestas cumplen lo establecido durante el desarrollo del método y la forma de hacerlo es midiendo la adecuabilidad del sistema cada vez que el método sea utilizado.

Las principales variaciones son:

- Estabilidad de las soluciones
- Tiempo de extracción
- Influencia o variaciones del pH en la fase móvil
- Influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil
- Uso de diferentes columnas cromatográficas (diferentes lotes y/o proveedores)
- Temperatura
- Flujo

### **ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN:**

Es necesario evaluar la estabilidad de la solución de la sustancia activa o producto farmacéutico, actualmente se cuenta con automuestreadores y las corridas pueden hacerse durante todo el día o la noche, la muestra debe estar en solución por horas, soportando los diferentes cambios en las condiciones ambientales del laboratorio. Esto afecta principalmente a los fármacos que pueden experimentar degradación por hidrólisis, fotólisis o adhesión en las paredes del contenedor de la muestra. Los datos deben demostrar la estabilidad de la solución de la muestra bajo las condiciones normales del laboratorio durante el tiempo de análisis.



## **ESPECIFICACIONES Y PRUEBAS PARA LA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA:**

La exactitud y la precisión de los datos derivados del análisis cromatográfico se aseguran mediante la evaluación de la adecuabilidad del sistema (System Suitability), esta evaluación consta generalmente del análisis estadístico de los resultados de la inyección de soluciones estándar a una concentración equivalente al 100% de la curva de calibración.

Las respuestas analíticas que se evalúan en la adecuabilidad del sistema son:

- factor de capacidad ( $k'$ )
- Area / altura de pico
- selectividad
- resolución ( $R_s$ )
- factor de coileo ( $T$ )
- número de platos teóricos ( $N$ )
- altura equivalente a un plato teórico (HETP)

## **1.7. METODOS GENERALES PARA LA DETERMINACION DE SALICILATO DE METILO Y BENCIDAMINA.**

En la literatura se han descrito algunas formas de analizar Salicilato de metilo y Bendidamina.

Los autores Oi-Wah Lau, Shiu-Fai Luk y Wai-Chu Wong<sup>8</sup> proponen un método voltamétrico para la determinación simultánea de Salicilato de metilo y timol en varias formulaciones farmacéuticas usando un electrodo de carbón (glass carbon electrode). En este método se utiliza un analizador polarográfico modelo 174A, un electrodo de Calomel saturado y un electrodo de Platino.

Las muestras se tratan con porciones de metanol, se colocan en un baño de ultrasonido y se lleva a un volumen de 100 mL. Una alícuota del electrolito de soporte se coloca dentro de la celda seca y se adiciona 0.1 mL de la solución de la muestra, se agita la muestra con un agitador magnético. Se detiene la agitación y se obtiene el voltamograma.

El pico de Salicilato de metilo aparece a 0.68 v y el timol a +0.35V, se continua con adiciones de la solución estándar de Salicilato de metilo y timol hasta 0.3 mL de cada uno, la cantidad de éstos en cada una de las muestras se determina por la adición de estándar, empleando la técnica de regresión lineal.

Este método es rápido, exacto y se basa en la oxidación del salicilato de metilo utilizando el electrodo de carbón. El método es sensible y puede detectar muy pequeñas cantidades en una preparación farmacéutica (cremas, aceites analgésicos líquidos). El método es reproducible.

Por otra parte Joseph P. Sapio y colaboradores<sup>9</sup>, proponen una determinación simultánea de Salicilato de metilo y mentol en un analgésico tóxico, la muestra se destila con vapor y el destilado es tratado con cloroformo y en la última etapa se condensa el vapor y las muestras son inyectadas en el sistema cromatográfico, las cantidades de alcanfor, mentol y Salicilato de metilo se cuantifican por la normalización de áreas de los picos.

El equipo utilizado es un Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama, una columna de vidrio de 180 cm X 3 mm i.d. empacada con 20% de polietilenglicol y como gas acarreador: Helio.

A la muestra se le adicionan 10 mL de la solución del estándar interno y se lleva a un volumen de 100 mL con una solución de hexano-cloroformo-metanol (50:50:3), el volumen de inyección es 1  $\mu$ L.

El método es lineal, exacto y selectivo ( en presencia del ácido salicílico y salicilato de etilo)

El principal producto de hidrólisis del salicilato de metilo es el ácido salicílico, y el etil salicina es el producto principal que se forma por la trans-esterificación entre el Salicilato de metilo y etanol (disolvente usado en la formulación).

La temperatura de inyección es 200 ° C , la temperatura de la columna es 155 ° C y el flujo es de 55 mL/min.

No hay interferencia debida a los excipientes de la formulación.

Saad S.M. Hassan y M.A. Hamada<sup>10</sup>, mencionan los métodos descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y en la Farmacopea Británica ( BP), para la determinación del ácido salicílico y salicilatos generados por la hidrólisis de la aspirina, y se basan en la titulación visual directa con un alcali, medición espectrofotométrica a 525 nm después de una reacción cromogénica con Fe (III), reacción con bromo seguido de una titulación yodométrica y separación por cromatografía de líquidos seguido por una medición a 280 nm. Sin embargo, muchos de estos métodos, involucran varios pasos de manipulación y sufren interferencia debida a ácidos aromáticos, fenoles y otros compuestos.

Las técnicas descritas para el análisis de salicilato de metilo incluyen: Cromatografía de capa fina, cromatografía gas- liquido, Cromatografía de líquidos de alta resolución, colorimetría, espectrofotometría, espectrofluorometría e inmunoensayo.

Los autores proponen la determinación selectiva de Salicilato de metilo en preparaciones farmacéuticas con un electrodo de membrana líquida, el tetraheptilamonio de Salicilato disperso en decan-1-ol o PVC (polivinil cloruro) y el tetraoctilamonio de Salicilato disuelto en p-nitrocimeno, los cuales se utilizan como

materiales de membrana. El mycobactin se usa como componente activo del electrodo de intercambio iónico líquido que responde al salicilato.

El mecanismo exacto de la extracción iónica y transporte por las membranas no es totalmente entendible, pero se cree que las porfirinas se comportan como un intercambiador de iones o acarreador neutral.

Utilizan un sensor de dióxido de carbono (gas) junto con la enzima salicilato hidrolasa para la determinación de salicilato de metilo.

La enzima cataliza la formación estequiométrica de catecol y dióxido de carbono a partir del salicilato y reduce el nucleótido de piridina en presencia de flavin adenina dinucleotido como un co-factor específico.

La cantidad de CO<sub>2</sub> (gas) detectado por el sensor es proporcional a la concentración de salicilato. El recobro promedio es de 98.9%

La BP 1998<sup>11</sup>, describe una técnica espectrofotométrica para la determinación de Clorhidrato de Bencidamina en una crema, la muestra se trata con etanol al 96%, se calienta hasta disolución total de la crema, se enfría en un baño de hielo hasta la formación de un precipitado blanco, se lleva la solución a 20°C, se adiciona etanol al 96% y se filtra la solución, se hace una dilución con metanol al 96% y se lee a 308 nm.

También se describe una técnica por Cromatografía de gases para un enjuague bucal y un spray oromucosal, que se trabaja con una columna de vidrio (2m x 2mm), con un soporte de diatomeas cubierto con un 3% (peso/peso) de fenil metil silicon fluido (50% fenil) (OV-17 es adecuado) y mantenida a 260° con un detector de ionización de flama.

### **1.8. METODOS ANALITICOS <sup>16</sup>:**

Todos los métodos analíticos, descritos anteriormente como procedimientos analíticos, tienen el mismo propósito. Estos se usan para determinar la identidad y/o cantidades de un compuesto, elemento o ion.

Los procedimientos se diferencian por la forma en que se lleva a cabo la determinación de los compuestos en una muestra determinada.

Uno de los propósitos más comunes para el desarrollo y aplicación de los métodos analíticos, es encontrar solución a los problemas analíticos.

La Estructura general de los procesos analíticos esencialmente es la misma y se puede resumir en cuatro puntos (fig. 6.):

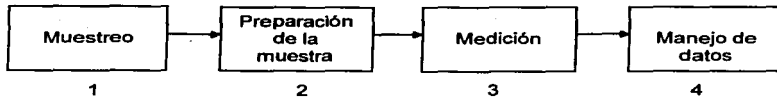


Fig.6. Proceso Analítico

Una muestra representativa (1), se trata (2) y mide (3) de tal forma que se pueda generar un resultado analítico significativo.

Cada una de las partes del procedimiento, o los cuatro juntos, deberán estar bajo estrictos controles, como la calibración del procedimiento, precisión, así como mantener las condiciones de temperatura y presión cuando así se requiera, para obtener resultados analíticos de calidad.

La medición es un proceso analítico que puede ser considerado como la parte central, su estudio se basa en hechos empíricos y consideraciones teóricas.

Sin embargo aunque existe gran variedad de instrumentos analíticos en el laboratorio, todos ellos tienen un principio de medición semejante, del mismo modo la transformación de las mediciones en resultados analíticos muestra un paralelismo entre los diferentes procedimientos.

La señal de salida aparece como un espectro, una imagen de dos dimensiones con picos y valles. Usualmente la posición de los picos en el espectro indica la identidad de los compuestos, elementos o iones presentes en la muestra, mientras que la altura de los picos o áreas esta correlacionada con las cantidades de esos componentes en la muestra tratada.

Los procedimientos analíticos de dos dimensiones pueden transformarse en procesos analíticos de más dimensiones o una sola dimensión.

Mientras que en un procedimiento analítico de dos dimensiones la señal de salida es medida como una función de una variable (tiempo, longitud de onda, voltaje,), la medición de la señal como una función de dos (ó más) variables, conduce a un modelo similar pero un tanto más complejo.

## EL PROCEDIMIENTO ANALITICO.

La caja negra.

Al referirse a un procedimiento analítico o un instrumento analítico como una caja negra significa que nada se conoce sobre el proceso y componentes físicos,

químicos, mecánicos o eléctricos que puedan transformar la muestra de composición desconocida en una muestra con composición conocida.

El procedimiento analítico como una caja negra puede ser descrito como se muestra en la fig. 7:

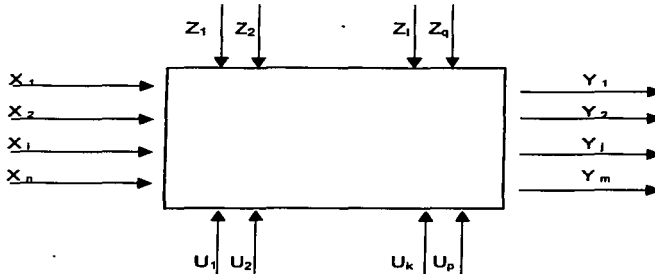


Fig.7. El procedimiento analítico como una caja negra.

Las variables  $X_1, X_2, \dots, X_n$  representan la composición (concentración, cantidades, identidades) y las variables que representan las mediciones (voltaje, lecturas). La relación de variables de entrada y salida  $X - Y$  es importante ya que influye en la generación de resultados analíticos a partir de las mediciones.

Las variables  $U$ , son las variables controlables y tienen gran influencia en la medición y por lo tanto en la relación de las variables de entrada y salida  $X - Y$ .

Las variables que no pueden ser controladas se indican como  $Z$  y generalmente se desconocen.

La figura anterior puede reducirse a un modelo con una sola variable  $X$  y una  $Y$ , en un análisis de una dimensión.

La información que se obtiene de la muestra, a partir del procedimiento analítico se ha definido como la diferencia entre la composición antes y después del análisis (fig. 8).

El procedimiento analítico se puede representar como:



Fig. 8. Estructura del procedimiento analítico.

La composición se clasifica como una propiedad. Esta propiedad es medida y cierto nivel de ruido se adiciona al proceso. La identificación es posible cuando la relación entre X y Y es conocida y cuando la señal no se oculta con el ruido.

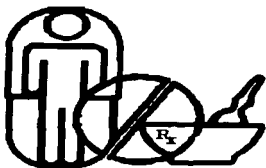
### 1.9. DISEÑO Y ANALISIS DE EXPERIMENTOS <sup>13</sup>:

El presente trabajo se lleva a cabo por diseño de experimentos, que es el proceso de planear un experimento para obtener datos apropiados, que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos, con la finalidad de generar conclusiones validas y objetivas.

Para realizar un diseño de experimentos es necesario:

- La comprensión y el planteamiento del problema: Un planteamiento claro del problema contribuye a un mejor conocimiento del fenómeno y la solución del problema.
- Elección de factores y niveles: El experimentador debe elegir los factores que varían durante el experimento, los intervalos de dicha variación y los niveles específicos a los cuales se realiza el experimento. Es importante investigar todos los factores que pueden afectar la respuesta a evaluar.
- Selección de la variable de respuesta: Al seleccionar la respuesta o variable dependiente se debe tener la seguridad de que la respuesta a medir realmente proporcione información útil sobre el proceso en estudio.
- Elección del diseño experimental: Para elegir el diseño se debe considerar el tamaño de la muestra (número de replicas), seleccionar el orden adecuado de cada ensayo.
- Realización del experimento: Al realizar el experimento es importante vigilar el proceso cuidadosamente para asegurar que todo se haga conforme a lo planeado ya que los errores en el proceso anulan la validez experimental.

- **Análisis de datos:** Para analizar los datos deben emplearse métodos estadísticos de modo que los resultados y conclusiones sean objetivos
- **Conclusiones y recomendaciones:** Al término del análisis de los datos se deben obtener conclusiones válidas, en esta fase del diseño de experimentos los métodos gráficos son muy útiles.



**Biofarmacia**

***CAPITULO III  
PARTE EXPERIMENTAL***

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## 2.1. SELECCIÓN DE LOS FACTORES QUE MODIFICAN LA RESPUESTA ANALÍTICA Y PLANTEAMIENTO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para mejorar la respuesta analítica y disminuir el factor de coe a un valor menor de 1.5, se estudiaron los factores que pueden modificar la respuesta de los solutos en la Cromatografía par-iónico, los cuales fueron:

- a) Concentración del reactivo par iónico (mM)
- b) lipofilicidad del reactivo par iónico.
- c) pH del medio (fase móvil)
- d) % B (polaridad de la fase móvil).
- e) Flujo (mL/min.)

### REACTIVOS:

Bencidamina, clorhidrato (sustancia de referencia)\*  
 Salicilato de metilo (sustancia de referencia)\*  
 Trietilamina R.A. J.T. Baker  
 Acetonitrilo HPLC Omnisolv  
 Acido acético glacial R.A. J.T. Baker  
 Indometacina (sustancia de referencia)\*

\*Donados por Laboratorios Farmacéuticos

### EQUIPO Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Cromatógrafo de líquidos	Beckman System Gold
Injector	Automático
Detector	Beckman Gold 166 UV o equivalente a 305 nm
Bomba	126 o equivalente
Columna	Novapack C18, de 150 X 3.9 mm, y 5 µm de tamaño de partícula
Flujo	1.0 mL/min
Fase móvil	Acetonitrilo (40)– agua (59) – ác. Acético (1)
Reactivo par – iónico	Trietilamina (TEA) 60 mM
Vol. Inyección	5 µL
Solución de referencia:	Concentración: 40 µg/mL de Analgésico (Bd), 80 µg/mL de Salicilato de Metilo (SM) y 20 µg/ mL de Indometacina (nd).

En el apéndice II se indica la preparación de las soluciones utilizadas en la validación del método analítico.

### PLANTEAMIENTO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

De acuerdo a los factores antes descritos se propuso el diseño experimental  $2^3$ , con el cual se deseaba obtener una adecuada separación de los picos de interés, la disminución del coeolo en la respuesta de la Bendidamina así como un tiempo de corrida aceptable.

El diseño experimental propuesto (tabla 2) tiene dos niveles que se codifican como -1 para el nivel bajo y +1 para el nivel alto y tres factores, A: %B ó polaridad de la fase móvil, B: Concentración del reactivo par-iónico (mM), y C: Flujo de la fase móvil (mL/min).

Tabla 2. Niveles y factores del diseño experimental.

	A	B	C
	% B (polaridad)	Concentración mM	Flujo mL/min
-1	45	10	1.0
+1	50	40	1.5

La tabla 3 muestra el diseño factorial  $2^3$  completo para este diseño, en la cual se indican los 16 experimentos a realizar:

Tabla 3. Diseño experimental.

	A	B	C	Tr1	Rs1	Rs2	T
Serie 1	1	-(45)	-(10)	-(1.0)			
	2	+(50)	-(10)	-(1.0)			
	3	-(45)	+(40)	-(1.0)			
	4	+(50)	+(40)	-(1.0)			
	5	-(45)	-(10)	+(1.5)			
	6	+(50)	-(10)	+(1.5)			
	7	-(45)	+(40)	+(1.5)			
	8	+(50)	+(40)	+(1.5)			
Serie 2	1	-(45)	-(10)	-(1.0)			
	2	+(50)	-(10)	-(1.0)			
	3	-(45)	+(40)	-(1.0)			
	4	+(50)	+(40)	-(1.0)			
	5	-(45)	-(10)	+(1.5)			
	6	+(50)	-(10)	+(1.5)			
	7	-(45)	+(40)	+(1.5)			
	8	+(50)	+(40)	+(1.5)			

Donde:

Tr1 = Tiempo de retención Bendidamina (Pico del principio activo de interés)

Rs1 = Resolución (pico de Bendidamina y Salicilato de metilo)

Rs2 = Resolución (pico de Salicilato de metilo e Indometacina)

T = Coeolo del pico de Bendidamina

Los datos que se obtuvieron del diseño 2<sup>3</sup> se analizaron mediante Statgraphics® para la obtención de las condiciones analíticas óptimas.

## 2.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PROPORCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO EN LA FASE MÓVIL.

El propósito de este diseño fue conocer el efecto en la retención de los solutos en la fase estacionaria de la columna (cambios en el coleo) al modificar la proporción de ácido acético en la fase móvil, debido a la ionización de la Bencidamina en un medio ácido, trabajando bajo las condiciones cromatográficas siguientes y el diseño experimental de la tabla 4:

Fase Móvil:	Acetonitrilo – agua - ác. Acético
	Condición 1.- (45:54:1)
	Condición 2.- (45:54.5:0.5)
Concentración Reactivo par- iónico:	TEA: 60 mM
Volumen de inyección:	5 µL
Flujo	1.0 mL / min

Tabla. 4. Diseño experimental para evaluar la proporción de ácido acético en la Fase móvil

Nivel	A Vol. ác. Acético	Tr	Rs	T
-1	- (0.5)			
+1				
2	+ (1.0)			

Donde:

Tr Tiempo de retención

Rs = Resolución

T= Coleo

Son las respuestas analíticas que se evaluaron.

## 2.3. VALIDACIÓN.

### 2.3.1. SELECTIVIDAD <sup>4,5</sup>.

Para evaluar la Selectividad la sustancia de referencia de clorhidrato de Bencidamina (BD), Salicilato de metilo (SM) y el placebo se sometieron a degradación bajo las condiciones que se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Preparación de muestras y condiciones para la degradación de los activos.

PRUEBA / SUSTANCIA DE REFERENCIA	OXI	ALC	AC	TEMP	TEMP
BENCIDAMINA	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
SALICILATO DE METILO	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
DEGRADAR CON	2 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10 %	2 mL NaOH 2N	2 mL HCl 2N,	80°C	2 mL de H <sub>2</sub> O a 40°C
TIEMPO (Días)	1	2	2	5	3

OXI = Oxidación; ALC = Alcalinidad; AC = Acidez; T= Temperatura

Para evaluar la selectividad del método frente a los excipientes del producto, se analizaron, además de las muestras derivadas de los estándares de referencia, blancos de los solventes empleados en la preparación de las muestras, así como muestras de placebo empleando el método de análisis desarrollado.

La concentración evaluada para los compuestos de interés fue de 40 µg/mL para Bencidamina y 80 µg/mL para Salicilato de metilo.

### 2.3.2. CURVA DE CALIBRACIÓN SIN EXCIPIENTES (LINEALIDAD DEL SISTEMA)

Se preparó una curva de calibración con los siguientes niveles de concentración: 50%, 75%, 100%, 125%, 150%; tomando como 100% una concentración de 40µg/ml de Bencidamina y 80 µg / mL de Salicilato de metilo (que son las concentraciones que se obtienen de la técnica de extracción).

Para ello se preparó una solución stock de concentración de 500µg/mL del estándar de Bencidamina, una solución stock de concentración de 1000 µg/mL del estándar de Salicilato de metilo y una solución del estándar interno a una concentración de 500 µg / mL, como se indica en el apéndice II.

A partir de estas soluciones se preparó la curva patrón de acuerdo a lo descrito en la tabla 6:

Tabla 6. Linealidad del Sistema. Preparación de Soluciones.

NIVEL (%)	Stock BD (mL)	Stock SM (mL)	Stock Ind (mL)	Llevar a volumen	Concentración (µg/ mL)		
					BD	SM	Ind
50	2	3	2	50	20	40	20
75	3	5	2	50	30	60	20
100	4	4	2	50	40	80	20
125	5	3	2	50	50	100	20
150	3	2	1	25	60	120	20

Se prepararon tres curvas de calibración. Las muestras se inyectaron por triplicado. El volumen de inyección fue de 5 µL.

Criterio de aceptación: Coeficiente de determinación:  $r^2 \geq 0.9800$  y Coeficiente de variación de los factores C.V.  $\leq 1.50\%$

### 2.3.3. CURVA DE CALIBRACIÓN CON EXCIPIENTES (LINEALIDAD DEL METODO)

Se prepararon tres curvas de calibración con los siguientes niveles de concentración cada una: 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, tomando como el 100% una formulación de Bendidamina al 5.0% y de Salicilato de metilo al 10%.

Se pesaron las muestras de placebo y de sustancias de referencia para la preparación de la curva de calibración de acuerdo a la tabla 7 (por triplicado), adicionando a cada una de las muestras 2 mL de la solución stock del estándar interno (conc. de 12.5 mg/mL):

Tabla 7. Linealidad del Método. Preparación de Soluciones.

Nivel	Aforo (mL)	Peso Bendidamina (g)	Peso Salicilato de Metilo (g)	Peso Placebo (g)	Concentración final (µg/mL)		
					Bd	SM	Ind
50 %	25	0.0250	0.050	0.9250	20	40	20
75 %	25	0.0375	0.075	0.8875	30	60	20
100 %	25	0.0500	0.100	0.8500	40	80	20
125 %	25	0.0625	0.125	0.8125	50	100	20
150 %	25	0.075	0.150	0.7750	60	120	20

Cada muestra de gel se analizó de acuerdo a la fig. 9.

Pesar en un matraz de 25 mL la cantidad de placebo, Clorhidrato de Bencidamina y Salicilato de metilo correspondiente a cada nivel, adicionar 2 mL de la solución del estándar interno (12.5 mg/mL)

↓  
Disolver con 5 mL de solución de ACN: Agua (90:10)  
Agitar 30 seg. en vortex

↓  
Llevar a volumen con la misma solución.

↓  
Tomar una alícuota de 2 mL de la solución anterior,  
transferir a un matraz de 100 mL y  
llevar a volumen con una solución de ACN-Agua (60:40)

↓  
Inyectar 5  $\mu$ L al Cromatógrafo

Fig. 9. Esquema del tratamiento de la muestra en la Linealidad del Método.

De cada nivel se realizaron tres extracciones y cada extracción se inyectó por triplicado.

**Criterio de aceptación:**

Los coeficientes de variación de los factores de cada nivel deben de ser  $\leq 2.0 \%$

De la gráfica: respuesta contra concentración:

$$r^2 \geq 0.9800$$

Pendiente (m) = aprox. 1.0000

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )  $\geq 0.9800$

ordenada al origen (b) = aprox 0.0000

### 2.3.4. REPRODUCIBILIDAD (REPETIBILIDAD)

Se analizó una muestra homogénea del producto terminado cercana a un nivel de concentración del 100%, el análisis se realizó por un analista por triplicado en dos días diferentes y realizando tres lecturas de cada muestra.

El procedimiento se encuentra descrito en el apéndice II.

Criterio de aceptación:

Coefficiente de variación  $\leq 2.0 \%$

### 2.3.5. PRECISION DEL SISTEMA

De los datos de la Linealidad del Sistema, se tomaron los datos del análisis al 100% y se prepararon tres puntos más al 100%, con el fin de contar con 6 determinaciones y tener una muestra representativa para poder aplicar las pruebas de variación. Se calculó el C.V., el cual no debería ser mayor al 1.50%

### 2.3.6. EXACTITUD

De los datos obtenidos en la Linealidad del método, se calculó el porcentaje recuperado tanto para Bendamina como Salicilato de metilo.

Para el Salicilato de metilo:

$$\%Recuperado = \frac{\text{Area m SM/Ind}}{\text{Area std SM/Ind}} \times \frac{P \text{ std SM}}{25} \times \frac{2}{100} \times \frac{100}{2} \times \frac{25}{PmSM} \times 100$$

Para la Bendamina:

$$\%Recuperado = \frac{\text{Area m Bd/Ind}}{\text{Area std Bd/Ind}} \times \frac{P \text{ std Bd}}{25} \times \frac{2}{100} \times \frac{100}{2} \times \frac{25}{PmBd} \times 100$$

Criterio: La desviación estándar debe ser  $\leq 2.0 \%$

El porcentaje de recuperación: 98.0 % - 102.0 %

### 2.3.7. TOLERANCIA DEL METODO

Con el fin de determinar la tolerancia del método se efectuaron las siguientes modificaciones a la fase móvil, las que se describen en la Tabla 8:

Tabla 8. Cambios en la proporción de solventes en la fase móvil, para la evaluación de la tolerancia del método.

ACETONITRILLO (% en la FM)	AGUA (% en la FM)	AC. ACETICO (% en la FM)	TRITILAMINA (Conc. en FM)
44.0	55.0	1.0	60 m M
40.0	59.0	1.0	60 m M
36.0	63.0	1.0	60 m M

El análisis se realizó por triplicado, empleando el mismo vial de inyección para evitar error por cambio de muestra. La muestra contenía una concentración de 40µg/mL de Analgésico, 80µg/mL de Salicilato de metilo y 20µg/mL del estándar interno de Indometacina.

Para evaluar el efecto de la proporción de los componentes de la fase móvil se calcularon los siguientes parámetros: forma de los picos (simetría), resolución, y factor de coleo.

### 2.3.8. ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA Y DE REFERENCIA

Para evaluar la estabilidad de la solución de la muestra se siguió el procedimiento descrito en la fig. 10.



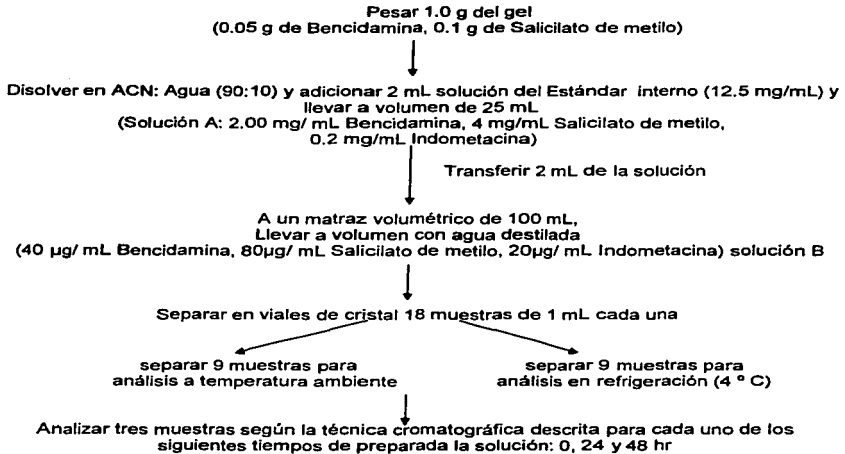


Fig. 10. Esquema del procedimiento de estabilidad de la solución de la muestra.

Para la evaluación de la estabilidad de la solución de referencia se siguió el procedimiento de la figura 11.

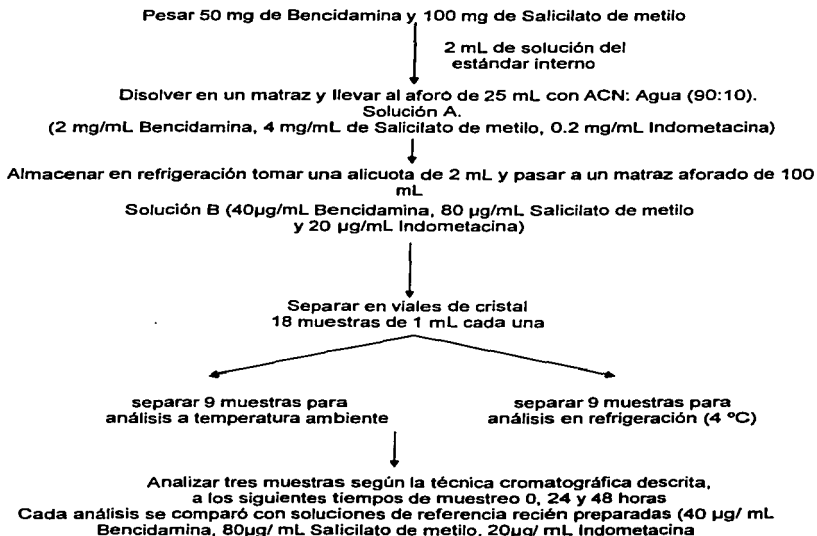


Figura 11. Esquema del procedimiento de estabilidad de la solución de referencia.

**Criterio:**

La diferencia entre los valores iniciales y la condición ensayada deben ser menores al 2.0 %.

### 2.3.9. ESTABILIDAD DE LA FASE MOVIL

La estabilidad de la fase móvil se evaluó a 24 horas y a una semana. Para ello se preparó la fase móvil y se almacenó en refrigeración (4°C) en matraces erlenmeyer de 500mL tapados con una capa de papel aluminio y con parafilm y se empleó hasta el momento de la evaluación. Así mismo se prepararon soluciones de estándar de Bencidamina con una concentración de 40 µg/mL, Salicilato de metilo de 80µg/mL y 20µg/mL de Indometacina los días de evaluación. Estas muestras se analizaron bajo la técnica de tratamiento descrita en el apéndice II y bajo las condiciones cromatográficas descritas para la validación del método analítico, empleando para el análisis tanto la fase móvil almacenada en refrigeración como una fase móvil recién preparada. Finalmente se realiza una comparación de los resultados obtenidos entre aquellos obtenidos con la fase móvil en refrigeración y los obtenidos con la fase móvil recién preparada.

Criterio: La desviación entre los valores debe ser menor a 2.0 %

### 2.3.10. LIMITE DE DETECCIÓN.

a) Determinación del nivel de ruido (NR):

Se pesó 1.0 g de placebo en un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió en 10 mL de una mezcla ACN:Agua 90:10 y se llevó a volumen con la misma solución (solución A). Se transfirieron 2 mL de la solución A a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevo a volumen con ACN:Agua (90:10)(solución B). El procedimiento se realizó por triplicado. El análisis de las muestras se realizó mediante la técnica de Cromatografía de líquidos ya descrita, inyectando 5 µL de la muestra. Se midió la magnitud de la respuesta del placebo (Nivel de ruido, NR).

b) Determinación del Límite de detección:

Posteriormente se calculó el promedio de las respuestas obtenidas, el cual multiplicado por un factor de 3 dió un estimado del límite de detección. Este valor se interpoló en las curvas de calibración del método y se obtuvo el valor teórico del límite de detección Este valor se comprobó analizando muestras de placebo adicionadas de la sustancias de referencia a las concentraciones cercanas al límite de detección.

### 2.3.11. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

a) Determinación del nivel de ruido (NR):

Se pesó 1.0 g de placebo en un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió en 10 mL de una mezcla ACN:Agua 90:10 y se llevó a volumen con la misma solución (solución A). Se transfirieron 2 mL de la solución A a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevo a volumen con ACN:Agua (90:10)(solución B). El procedimiento se realizó por triplicado. El análisis de las muestras se realizó mediante la técnica de

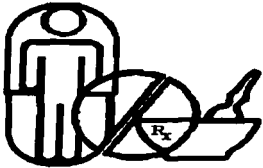
Cromatografía de líquidos ya descrita, inyectando 5  $\mu\text{L}$  de la muestra. Se midió la magnitud de la respuesta del placebo (Nivel de ruido, NR).

**b) Determinación del límite de cuantificación:**

Posteriormente se calculó el promedio de las respuestas obtenidas, el cual multiplicado por un factor de 10 dió un estimado del límite de cuantificación. Este valor se interpoló en las curvas de calibración del método y se obtuvo el valor teórico del límite de cuantificación. Este valor se comprobó analizando muestras de placebo adicionadas de la sustancias de referencia a las concentraciones cercanas al límite de cuantificación.

**Criterio:** El coeficiente de variación debe ser  $\leq 10.0\%$

Se comprobó este límite analizando muestras de placebo adicionadas de la concentración cercana al límite de cuantificación.



**Biofarmacia**

***CAPITULO IV  
RESULTADOS Y  
DISCUSION DE  
RESULTADOS***

**3.1. RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL:**

En la tabla 9 se muestran los resultados de tiempo de retención (Tr), resolución de pico (Rs) y coeio (T) obtenidos empleando el diseño experimental 2<sup>3</sup> descrito en la sección 2.1.:

Tabla 9. Resultados del Diseño experimental.

		A	B	C	Tr1	Rs1	Rs2	T
Serie 1	1	-(45)	-(10)	-(1.0)	1.74	0.69	0.92	2.28
	2	+(50)	-(10)	-(1.0)	4.48	1.44	6.00	1.65
	3	-(45)	+(40)	-(1.0)	3.05	1.58	3.74	1.50
	4	+(50)	+(40)	-(1.0)	2.00	2.08	0.80	1.50
	5	-(45)	-(10)	+(1.5)	1.11	1.02	0.66	3.00
	6	+(50)	-(10)	+(1.5)	3.07	0.78	5.076	2.00
	7	-(45)	+(40)	+(1.5)	1.35	1.80	1.51	2.25
	8	+(50)	+(40)	+(1.5)	1.32	1.10	0.65	1.50
Serie 2	1	-(45)	-(10)	-(1.0)	1.64	1.17	0.69	2.33
	2	+(50)	-(10)	-(1.0)	4.63	1.55	6.30	2.10
	3	-(45)	+(40)	-(1.0)	3.12	1.79	3.50	1.78
	4	+(50)	+(40)	-(1.0)	1.99	2.11	0.83	1.50
	5	-(45)	-(10)	+(1.5)	1.12	1.08	0.74	1.81
	6	+(50)	-(10)	+(1.5)	3.06	1.08	6.10	1.61
	7	-(45)	+(40)	+(1.5)	1.35	1.62	1.51	1.60
	8	+(50)	+(40)	+(1.5)	1.32	1.25	0.63	1.25

Donde:

Tr1= Tiempo de retención Bendidamina (Pico del principio activo de interés)

Rs1 = Resolución (pico de Bendidamina y Salicilato de metilo)

Rs2= Resolución (pico de Salicilato de metilo e Indometacina)

T= Coleo del pico de Bendidamina

**3.1.1. RESULTADOS PARA RS 1 (RESOLUCIÓN ENTRE EL PICO DE BENCIDAMINA Y SALICILATO DE METILO):**

En la tabla 10 se muestran los datos de los efectos estimados para la respuesta Rs1, obtenidos mediante el análisis estadístico por Statgraphics®:

Tabla 10. Efectos estimados para Rs1

Promedio	=	1.38375	+/-	0.412689
A: Acetonitrilo	=	0.08	+/-	0.0825379
B: Concentración	=	0.565	+/-	0.0825379
C: Flujo	=	- 0.335	+/-	0.0825379
AB	=	- 0.1425	+/-	0.0825379
AC	=	- 0.4075	+/-	0.0825379
BC	=	- 0.1125	+/-	0.0825379
ABC	=	- 0.065	+/-	0.0825379

**ANÁLISIS DEL MODELO:**

Para el cálculo del análisis de varianza utilizamos los resultados obtenidos en la tabla 10, considerando como:

$$\text{Hipótesis nula} \\ H_0 = E_1 = 0$$

$$\text{Hipótesis alternativa} \\ H_1 = E_1 \neq 0$$

Donde:

El efecto de los factores es cero                      y                      El efecto de los factores es diferente de cero

Donde los factores experimentales que se evaluaron son:

A: %B ó polaridad de la fase móvil

B: Concentración del reactivo par-iónico (mM)

C: Flujo de la fase móvil (mL/min).

Las hipótesis se contrastan contra cero, ya que el objetivo es detectar los factores que tienen un efecto significativo sobre la respuesta analítica, los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis de varianza para Rs1

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados medio	F
<b>A: ACN</b>	0.0256	1	0.0256	0.94
<b>B: Conc.</b>	1.2769	1	1.2769	46.86
<b>C: Flujo</b>	0.4489	1	0.4489	16.47
<b>AB</b>	0.081225	1	0.081225	2.98
<b>AC</b>	0.664225	1	0.664225	24.38
<b>BC</b>	0.050625	1	0.050625	1.86
<b>ABC</b>	0.0169	1	0.0169	0.62
<b>Error total</b>	0.218	8	0.0273	
<b>Total (Corr.)</b>	2.78238	15		

Al examinar la tabla de análisis de varianza encontramos que para el factor B (Concentración del reactivo par iónico)  $F_0 = 46.86$  valor mayor que  $F$  de tablas = 5.32, por lo que  $H_0$  se rechaza y se acepta  $H_1$ , lo mismo para el factor C (Flujo de la fase móvil) que presenta una  $F_0 = 16.47$  y con AC (interacción del % ACN y Flujo) con una  $F_0 = 24.38$ .

De acuerdo a lo anterior se concluye que los efectos del factor Concentración del reactivo par iónico (B) y el factor Flujo de la fase móvil (C), y la interacción del % de ACN y Flujo de la fase móvil (AC) son significativos para la respuesta de resolución (Rs1) entre el pico de la Bencidamina y el Salicilato de metilo con un nivel de confianza del 95%.

El coeficiente de regresión obtenido para Rs1 es mayor al 80%, lo cual nos indica que el modelo matemático y la concordancia entre la ecuación y los datos experimentales son aceptables (tabla 12).

$r = 96.0$

Tabla 12. Coeficientes de regresión para Rs1

Constante	= - 15.945
A: ACN	= 0.362667
B: Conc.	= - 0.078
C: Flujo	= 11.0733
AB	= 0.00243333
AC	= - 0.239333
BC	= 0.149667
ABC	= - 0.00346667

La ecuación de regresión para Rs1 es:

$$Rs1 = - 15.945 + 0.362667 * ACN - 0.078 * Concentración + 11.0733 * Flujo + 0.00243333 * ACN * ACN * Concentración - 0.239333 * ACN * Flujo + 0.149667 * Concentración * Flujo - 0.00346667 * ACN * Concentración * Flujo$$

Al sustituir diferentes valores en cada factor de la ecuación, se encontró que:

Flujo: 1.0 mL/min (Codificado = -1)

Concentración: 60 mM (Codificado = +1)

ACN: 40 % (Codificado = +1)

$$Rs1 = - 15.945 + 0.362667 * 40 - 0.078 * 60 + 11.0733 * 1 + 0.00243333 * 40 * 60 - 0.239333 * 40 * 1 + 0.149667 * 60 * 1 - 0.00346667 * 40 * 60 * 1 = 1.88$$

La ecuación presenta los valores reales que corresponden a los valores codificados (+1 y -1).

En la tabla 13 se muestran diferentes valores de Rs1 y las condiciones a las cuales se obtendrán estas respuestas, al sustituir los valores en la ecuación del modelo.

Tabla 13. Proyecciones para Rs1

Rs1	Concentración	ACN	Flujo
1.5	47.41	33.77	1.0
1.8	60.00	40.00	1.0
2.0	63.90	40.00	1.0
5.0	162.80	90.84	1.0

En la fig. 12 se muestra el posible comportamiento de la respuesta Rs1 (Resolución entre la respuesta de la Bencidamina y el Salicilato de Metilo) al variar cada uno de los factores. En ella se observa que al aumentar la concentración del reactivo par -



iónico y disminuir la polaridad de la fase móvil aumenta Rs1, sin embargo las mejores respuestas se obtuvieron al emplear las condiciones descritas en la tabla 14.

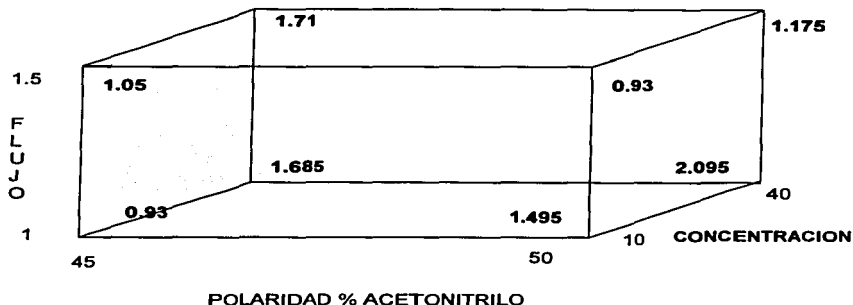


Fig. 12. Gráfica de cubo para Rs1.

Tabla 14. Condiciones óptimas para Rs1

RESPUESTA	1.685	1.71	2.095
% ACETONITRILO	45	45	50
FLUJO	1.0	1.5	1.0
CONCENTRACION mM	40	40	40

Se puede observar que las mejores respuestas se obtienen con una mayor concentración de reactivo par iónico, factor que tiene un efecto significativo sobre la respuesta analítica como se mostró en el análisis de varianza.

### 3.1.2. RESULTADOS PARA RS 2 (RESOLUCIÓN ENTRE SALICILATO DE METILO Y EL ESTÁNDAR INTERNO):

En la tabla 15 se muestran los datos de los efectos estimados para la respuesta Rs2, obtenidos mediante el análisis estadístico por Statgraphics ®.

Tabla 15. Efectos estimados para Rs2.

<b>Promedio</b>	=	2.4785	+/-	0.0700663
<b>A: Acetonitrilo</b>	=	1.6395	+/-	0.140133
<b>B: Concentración</b>	=	- 1.6645	+/-	0.140133
<b>C: Flujo</b>	=	- 0.738	+/-	0.140133
<b>AB</b>	=	- 3.477	+/-	0.140133
<b>AC</b>	=	0.3695	+/-	0.140133
<b>BC</b>	=	- 0.4045	+/-	0.140133
<b>ABC</b>	=	0.598	+/-	0.140133

Tomando en cuenta las mismas hipótesis propuestas para Rs1 y considerando que  $F$  tablas = 5.32, se encontró que todos los factores, descritos en la sección 3.1.1, y sus interacciones tienen una  $F_0$  mayor a la  $F$  de tablas, por lo que se acepta la hipótesis alternativa  $H1$  ya que todos los factores y sus interacciones tienen un efecto significativo sobre Rs2, a un nivel de confianza de 95% (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de varianza para Rs2.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados medio	F
<b>A: ACN</b>	10.7518	1	10.7518	136.88
<b>B: Conc.</b>	11.0822	1	11.0822	141.09
<b>C: Flujo</b>	2.17858	1	2.17858	27.74
<b>AB</b>	48.3581	1	48.3581	615.65
<b>AC</b>	0.546121	1	0.546121	6.95
<b>BC</b>	0.654481	1	0.654481	8.33
<b>ABC</b>	1.43042	1	1.43042	18.21
<b>Error total</b>	0.628368	8	0.0785485	
<b>Total (Corr.)</b>	75.6302	15		

El coeficiente de regresión obtenido para Rs2 es mayor al 80%, lo cual nos indica que el modelo matemático y la concordancia entre la ecuación y los datos experimentales son aceptables.

$$r = 99.58 \%$$

Tabla 17 Coeficientes de regresión para Rs2

<b>Constante</b>	=	- 96.393
<b>A: ACN</b>	=	2.11407
<b>B: Conc.</b>	=	4.1077
<b>C: Flujo</b>	=	23.7047
<b>AB</b>	=	- 0.0862267
<b>AC</b>	=	- 0.501733
<b>BC</b>	=	- 1.56887
<b>ABC</b>	=	0.0318933

**Ecuación de regresión para Rs2:**

$$Rs2 = -96.393 + 2.11407 * ACN + 4.1077 * Concentración + 23.7047 * Flujo - 0.0862267 * ACN * Concentración - 0.501733 * ACN * Flujo - 1.56887 * Concentración * Flujo + 0.0318933 * ACN * Concentración * Flujo$$

Al sustituir diferentes valores en cada factor, se encontró que:

**Flujo:** 1.0 mL/min (Codificado = -1)

**Concentración:** 60 mM (Codificado = +1)

**ACN:** 40 % (Codificado = +1)

$$Rs2 = -96.393 + 2.11407 * 40 + 4.1077 * 60 + 23.7047 * 1 - 0.0862267 * 40 * 60 - 0.501733 * 40 * 1 - 1.56887 * 60 * 1 + 0.0318933 * 40 * 60 * 1 = 13.73$$

La ecuación presenta los valores reales que corresponden a los valores codificados (+1 y -1).

En la tabla 18 se muestran diferentes valores de Rs2 y las condiciones a las cuales se tendrán estas respuestas, al sustituir los valores en la ecuación del modelo.

**Tabla 18. Proyecciones para Rs2.**

Rs2	Concentración	ACN	Flujo
1.5	26.82	40	1.0
2.0	27.89	40	1.0
13.73	60	40	1.0

De acuerdo a lo observado en la fig. 13 donde se muestra el posible comportamiento de la respuesta Rs2 (Resolución entre la respuesta de la del Salicilato de Metilo y el estándar interno) al variar cada uno de los factores, tenemos que al disminuir la concentración del reactivo par - iónico y la polaridad de la fase móvil aumenta Rs2, sin embargo, las mejores respuestas se obtuvieron al emplear las condiciones descritas en la tabla 19, lo cual nos sirvió de referencia para determinar las condiciones finales a las cuales se obtendría la mejor respuesta:

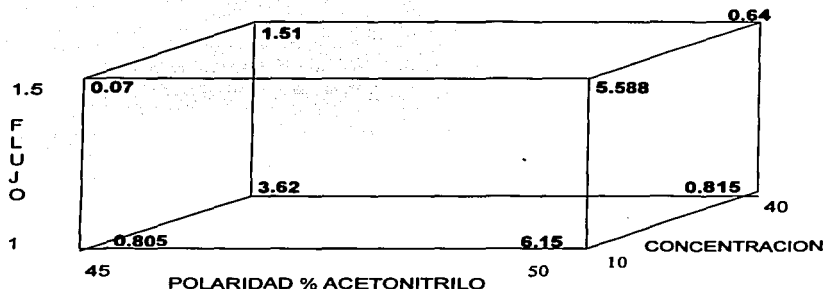


Fig. 13. Gráfica de cubo para Rs2.

Tabla 19. Condiciones óptimas para Rs2

RESPUESTA	3.62	6.58	6.15
% ACETONITRILLO	45	50	50
FLUJO	1.0	1.5	1.0
CONCENTRACION mM	40	10	10

### 3.1.3. RESULTADOS PARA T (COLEO):

En la tabla 20 se muestran los valores de los efectos estimados para la respuesta T, obtenidos mediante el análisis estadístico por Statgraphics ®:

Tabla 20. Efectos estimados para la respuesta de Coleo (T)

Promedio	=	1.82813	+/-	0.0612532
A: Acetonitrilo	=	- 0.37875	+/-	0.122506
B: Concentración	=	- 0.43625	+/-	0.122506
C: Flujo	=	- 0.00375	+/-	0.122506
AB	=	0.03375	+/-	0.122506
AC	=	- 0.09375	+/-	0.122506
BC	=	0.08375	+/-	0.122506
ABC	=	- 0.11125	+/-	0.122506

Tomando en cuenta las mismas hipótesis que se proponen para Rs1 y a los datos de la tabla 25, de acuerdo a la F tablas = 5.32, se encontró que los factores A (% ACN) y B (concentración del reactivo par iónico) tienen una  $F_0 = 9.56$  y  $12.68$  respectivamente,

estos valores son mayores a la F de tablas, por lo que  $H_0$  se rechaza y se acepta  $H_1$  (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de varianza para T (Coleo del pico de Bencidamina).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados medio	F
<b>A: ACN</b>	0.573806	1	0.573806	9.56
<b>B: Conc.</b>	0.761256	1	0.761256	12.68
<b>C: Flujo</b>	0.0005625	1	0.0005625	0.00
<b>AB</b>	0.00455625	1	0.00455625	0.08
<b>AC</b>	0.0351563	1	0.0351563	0.59
<b>BC</b>	0.0280563	1	0.0280563	0.47
<b>ABC</b>	0.0495062	1	0.0495062	0.82
<b>Error total</b>	0.48025	8	0.0600312	
<b>Total (Corr.)</b>	1.93264	15		

De acuerdo a lo anterior se concluyó que los efectos de proporción de ACN en la fase móvil (A) y Concentración del reactivo par iónico (B) son significativos con un nivel de confianza de 95%.

El coeficiente de regresión obtenido para T fué mayor al 80%, lo cual indica que el modelo matemático y la concordancia entre la ecuación y los datos experimentales son aceptables (tabla 22).

$$r = 86.69\%$$

Tabla 22. Coeficientes de regresión para T

<b>Constante</b>	= 11.0367
<b>A: ACN</b>	= - 0.178667
<b>B: Conc.</b>	= - 0.402167
<b>C: Flujo</b>	= - 3.77
<b>AB</b>	= 0.000786667
<b>AC</b>	= 0.0733333
<b>BC</b>	= 0.293
<b>ABC</b>	= - 0.00593333

Ecuación de regresión para T:

$$T = 11.0367 - 0.178667 * ACN - 0.402167 * Concentración - 3.77 * Flujo + 0.00786667 * ACN * Concentración + 0.0733333 * ACN * Flujo + 0.293 * Concentración * Flujo - 0.00593333 * ACN * Concentración * Flujo$$

Al sustituir diferentes valores en cada factor, se encontró que:

**Flujo:** 1.0 mL/min (Codificado = -1)

**Concentración:** 60 mM (Codificado = +1)

**ACN:** 40 % (Codificado = +1)

$$T = 11.0367 - 0.178667 * 40 - 0.402167 * 60 - 3.77 * 1 + 0.00786667 * 40 * 60 + 0.0733333 * 40 * 1 + 0.293 * 60 * 1 - 0.00593333 * 40 * 60 * 1 = 1.14$$

La ecuación presenta los valores reales que corresponden a los valores codificados (+1 y -1).

En la tabla 23 se muestran diferentes valores de T y las condiciones a las cuales se tendrán estas respuestas, al sustituir los valores en al ecuación del modelo.

Tabla 23. Proyecciones para T.

T	Concentración	ACN	Flujo
1.14	60	40	1.0
1.3	60	40.82	1.0
1.5	60	41.88	1.0
2.0	60	44.52	1.0

De acuerdo a lo observado en la fig. 14 donde se muestra el comportamiento de la respuesta T (Coleo del pico de Bencidamina) al variar cada uno de los factores, se encontró que al aumentar la concentración del reactivo par – iónico y al disminuir

la polaridad de la fase móvil aumenta Rs1, sin embargo las respuestas con el menor coleo se obtuvieron al emplear las condiciones descritas en la tabla 24.

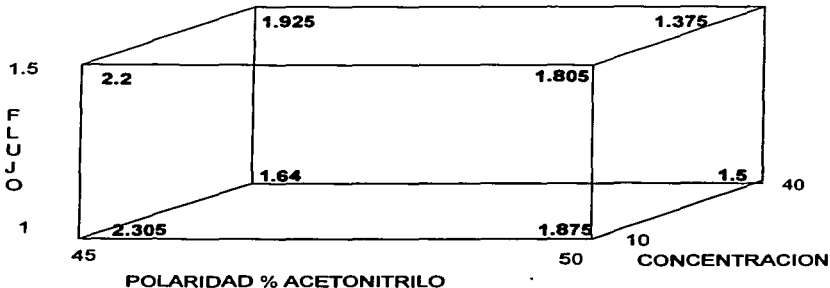


Fig. 14. Gráfica de cubo para T.

Tabla 24. Condiciones óptimas para T.

RESPUESTA	1.375	1.5	1.64
% ACETONITRILLO	50	50	45
FLUJO	1.5	1	1
CONCENTRACION mM	10	40	40

Las tres respuestas que se obtienen son menores a 2, valor considerado como límite superior.

### 3.1.4. RESULTADOS PARA LA RESPUESTA TR (TIEMPO DE RETENCIÓN DE BENCIDAMINA):

En la tabla 25 se muestran los datos de los efectos estimados para la respuesta Tr, obtenidos mediante el análisis estadístico por Statgraphics®:

Tabla 25. Efectos estimados para la respuesta de Coleo (Tr)

<b>Promedio</b>	=	2.27188	+/-	0.0121353
<b>A: Acetonitrilo</b>	=	0.92375	+/-	0.0242706
<b>B: Concentración</b>	=	- 0.66875	+/-	0.0242706
<b>C: Flujo</b>	=	- 1.11875	+/-	0.0242706
<b>AB</b>	=	- 1.48375	+/-	0.0242706
<b>AC</b>	=	0.03625	+/-	0.0242706
<b>BC</b>	=	- 0.08625	+/-	0.0242706
<b>ABC</b>	=	0.49375	+/-	0.0242706

Tomando en cuenta las mismas hipótesis que se proponen para Rs1, de acuerdo a la F tablas = 5.32, tenemos que todos los factores, proporción de Acetonitrilo en la fase móvil (A), Concentración del reactivo par iónico (B), y Flujo de la fase móvil (C), e interacciones AB, BC; y ABC tienen una  $F_0$  con valores mayores a la F de tablas, por lo que  $H_0$  se rechaza y se acepta  $H_1$  (tabla 26).

Tabla 26. Análisis de varianza para Tr

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados medio	F
<b>A: ACN</b>	3.14326	1	3.14326	14448.60
<b>B: Conc.</b>	1.78891	1	1.78891	759.22
<b>C: Flujo</b>	5.00641	1	5.00641	2124.73
<b>AB</b>	8.80606	1	8.80606	3737.32
<b>AC</b>	0.00525625	1	0.0525625	2.23
<b>BC</b>	0.0297562	1	0.0297562	12.63
<b>ABC</b>	0.975156	1	0.975156	413.86
<b>Error total</b>	0.01885	8	0.00235625	
<b>Total (Corr.)</b>	20.0436	15		

De acuerdo a lo anterior se concluyó que los efectos de A, B, C, interacción AB, BC; y ABC son significativos con un nivel de confianza de 95%.

El coeficiente de regresión obtenido para Tr fue mayor al 80%, lo cual indica que el modelo matemático y la concordancia entre la ecuación y los datos experimentales son aceptables (tabla 27).

$r = 99.95 \%$

Tabla 27. Coeficientes de regresión para Tr

Constante	= - 64.3683
A: ACN	= 1.466
B: Conc.	= 2.49533
C: Flujo	= - 0.0527
AB	= - 0.629333
AC	= - 1.26233
BC	= 0.0263333
ABC	= - 0.00593333

**Ecuación de regresión para el tiempo de retención:**

$$Tr = - 64.3683 + 1.466 * ACN + 2.49533 * Concentración + 27.9433 * Flujo - 0.0527 * ACN * Concentración - 0.629333 * ACN * Flujo - 1.26233 * Concentración * Flujo + 0.0263333 * ACN * Concentración * Flujo$$

En la fig. 15 se muestra el posible comportamiento de la respuesta Tr (Tiempo de retención de Bendidamina) al variar cada uno de los factores, en ella se puede observar que al aumentar el % de Acetonitrilo en la fase móvil y disminuir la concentración del reactivo par - iónico se aumenta el tiempo de retención de la Bendidamina (Bd).

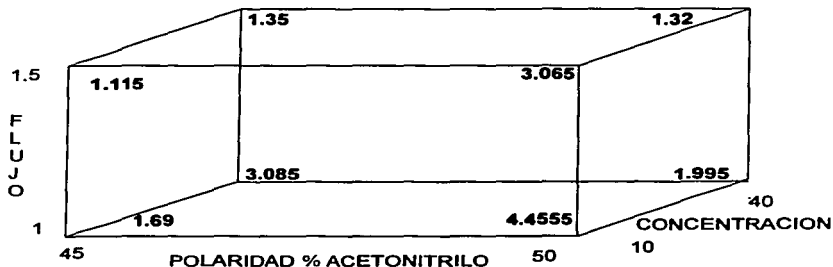


Fig. 15: Gráfica de cubo para Tr.



### 3.1.5. Discusión final del diseño experimental:

El propósito de este estudio fué disminuir el coleo que presenta el pico de la Bendidamina, por lo que basándonos en la tabla 28, el mejor resultado para la respuesta de coleo es 1.375 y se obtuvo con un 50 % de Acetonitrilo en la fase móvil, flujo de 1.5 y una concentración de TEA de 40mM.

Bajo estas mismas condiciones las respuestas Rs1 y Rs2, dieron valores de 1.175 y 0.64, en la tabla 28 se presenta información de las gráficas de cubo para cada respuesta. La parte sombreada de la tabla muestra las condiciones a las cuales se obtuvieron las mejores respuestas analíticas, valores de resolución mayores a 1.5 y coleo menor a 2.0.

Tabla 28. Comparativo de las Respuesta Analíticas

%B	React. Par iónico mM	Flujo	Rs1	Rs2	T
45	10	1.0	0.930	0.805	2.305
50	10	1.0	1.495	6.150	1.875
45	40	1.0	1.685	3.620	1.640
50	40	1.0	2.095	0.815	1.500
45	10	1.5	1.050	0.070	2.200
50	10	1.5	0.930	5.588	1.805
45	40	1.5	1.710	1.510	1.925
50	40	1.5	1.175	0.640	1.375

Analizando estos datos se encontró que al disminuir la concentración del reactivo par iónico de 40 mM a 10 mM y manteniendo el %B en 45 y el flujo a 1 mL/min aumenta el coleo del pico de Bendidamina y disminuye Rs1 y Rs2, mientras que el aumentar el flujo a 1.5 mL/min, manteniendo el %B en 45 y la concentración del reactivo par iónico en 40 mM, la Rs1 aumenta ligeramente y Rs2 disminuye, mientras que el coleo de la Bendidamina es menor a 2.0.

Al cambiar la %B a 50, mantener el flujo en 1.0 mL/min y la concentración del reactivo par iónico en 40 mM, la Rs1 aumenta, Rs2 disminuye y el coleo mejora ya que se obtiene el valor de 1.5.

Con base en lo anteriormente descrito se tomaron como referencia las siguientes condiciones:

%B = 45 % ACN  
 Concentración de TEA = 40 mM  
 Flujo = 1.0 mL/min

### 3.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PROPORCIÓN DE ACIDO ACETICO EN LA FASE MOVIL:

En la tabla 29 se puede observar que la adición de una mayor cantidad de ácido acético disminuye el coleo en el pico de Bencidamina, lo cual aumenta la precisión en la cuantificación del activo. Por lo tanto se decidió mantener en 1.0 mL la cantidad de ácido acético en la fase móvil, que es la cantidad utilizada en el diseño experimental.

Tabla 29. Resultados de la evaluación de la proporción de ácido acético en al fase móvil.

	Muestra	Tr1	Tr2	Tr3	Rs1	Rs2	T
1 mL de	1	2.43	3.36	4.98	0.972	1.012	1.477
	2	2.44	3.36	5.00	0.951	0.955	1.311
Acido	3	2.43	3.60	4.92	0.965	0.843	1.277
acético	4	2.44	3.61	4.96	0.877	0.964	1.405
	5	2.41	3.6	4.93	0.939	0.927	1.367
0.5 mL	1	2.89	4.3	5.18	1.083	0.613	1.510
Acido	2	2.85	4.27	5.15	1.027	0.593	1.533
acético	3	2.90	4.31	5.20	0.972	0.593	1.449
1 mL de	<b>Total</b>	12.15	17.53	24.79	4.70	4.70	6.84
Acido	<b>Promedio</b>	2.43	3.51	4.96	0.94	0.94	1.37
Acético	<b>DE</b>	0.01	0.13	0.03	0.04	0.06	0.08
	<b>CV</b>	0.50	3.8	0.67	4.03	6.63	5.76
0.5 mL	<b>Total</b>	8.64	12.88	15.53	3.08	1.80	4.49
Acido	<b>Promedio</b>	2.88	4.29	5.18	1.03	0.60	1.50
acético	<b>DE</b>	0.03	0.02	0.03	0.06	0.01	0.04
	<b>CV</b>	0.92	0.48	0.49	5.41	1.93	2.91

	A	Tr1	Tr2	Rs1	Rs2	T
1	- (0.5)	2.88	4.29	1.03	0.60	1.50
2	+ (1.0)	2.43	3.51	0.94	0.94	1.37

Donde:

Tr1= Tiempo de retención de Bencidamina

Tr2= Tiempo de retención Salicilato de metilo

Rs1= Resolución entre BD y SM

Rs2= Resolución entre SM e IND

T= Coleo del pico de Bencidamina

Tiempo de corrida = 10 minutos

### **3.3. Condiciones finales:**

Antes de proceder a la validación de la metodología desarrollada se realizaron pruebas con muestras de producto terminado, observándose una disminución en la resolución de los picos al trabajar con las condiciones descritas anteriormente, de acuerdo a los resultados obtenidos sobre el comportamiento de las respuestas analíticas en el diseño de experimentos descritos en las secciones 3.1.1, 3.1.2 y 3.1.3, donde se observó que al aumentar la concentración del reactivo par iónico y disminuir la proporción de la fase orgánica en la fase móvil se obtiene una disminución del coe, se decidió trabajar bajo las condiciones cromatográficas siguientes:

Cromatógrafo de líquidos	Beckman System Gold
Inyector	Automático
Detector	Beckman Gold 166 UV o equivalente a 305 nm
Bomba	126 o equivalente
Columna	Novapack C18, de 150 X 3.9 mm, y 5 µm de tamaño de partícula
%B en la fase móvil	40 % ACN
Concentración de TEA	60 mM
Flujo	1.0 mL/min
Vol. inyección	5 µL

### 3.4. VALIDACION

#### 3.4.1. SELECTIVIDAD:

Bajo las condiciones descritas en la sección 3.3. se obtuvo un método analítico selectivo, no presentándose señales adicionales a las de interés.

A continuación se presentan los cromatogramas típicos de la selectividad y en el apéndice III se encuentra la serie completa.

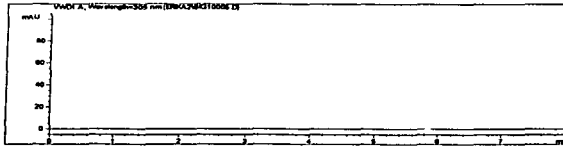


Figura 16  
Fase móvil utilizada en el método.

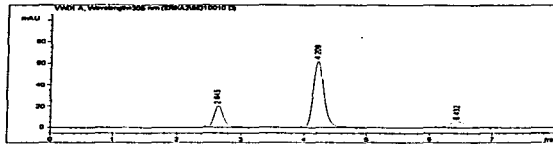


Figura 17  
Solución de referencia, la cual contiene Bendidamina ( $Tr = 2.645$  min),  
Salicilato de metilo ( $Tr = 4.209$  min) e Indometacina ( $Tr = 6.432$  min).

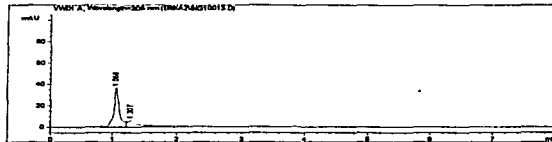


Figura 18  
Muestra Blanco de NaOH, se presentan dos señales  
( $Tr = 1.068$  min y  $1.307$  min) que corresponden a la NaOH.

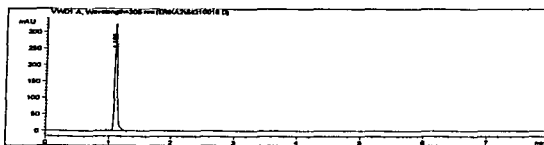


Figura 19  
Muestra Blanco de HCl, Se presenta una señal  
(Tr = 1.100 min) la cual corresponde al HCl.

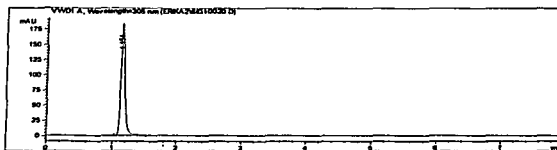


Figura 20  
Muestra Blanco de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se presenta una señal  
(Tr=1.151 min) la cual corresponde al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

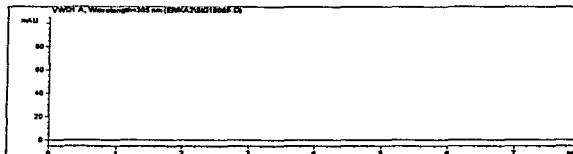


Figura 21  
Muestra Placebo en medio básico (NaOH)

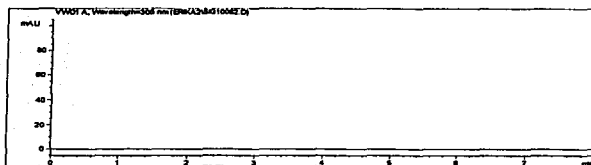


Figura 22  
Muestra Placebo en medio ácido (HCl)

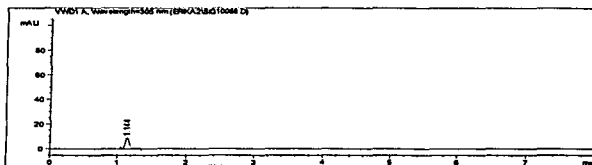


Figura 23  
Muestra Placebo en medio oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### 3.4.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA:

En la tabla 30 se presentan los resultados de Linealidad del Sistema para Bendidamina y Salicilato de metilo, y en la figura 24 se muestra la gráfica correspondiente en la que se observa que existe relación lineal entre la respuesta y la concentración en el intervalo de 0.0250 mg/mL a 0.0750 mg/mL (50.0 -150.0%), por lo que el sistema es lineal para Bendidamina.

Tabla 30. Análisis estadístico para la Linealidad del sistema.

		BD/Ind	SM/Ind
50	promedio	0,02	0,06
	d.e.	1,53E-04	8,08E-04
	c.v.	0,90	1,26
75	promedio	0,02	0,06
	d.e.	1,86E-04	8,79E-04
	c.v.	1,10	1,40
100	promedio	0,02	0,06
	d.e.	2,34E-04	4,18E-04
	c.v.	1,38	0,66
125	promedio	0,02	0,06
	d.e.	1,34E-04	5,28E-04
	c.v.	0,78	0,83
150	promedio	0,02	0,06
	d.e.	2,21E-04	8,04E-04
	c.v.	1,28	1,27

El coeficiente de variación de los factores es  $\leq 1.5\%$ .

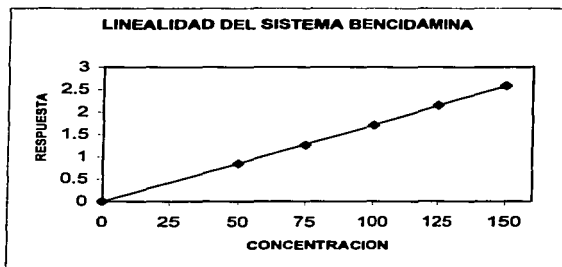


Fig. 24. Linealidad del Sistema para Bendidamina.

<b>m</b>	0.0174
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9999
<b>r</b>	0.9999
<b>b</b>	-0.0238

Ecuación de la recta:  $Y = m x + b$   
 $Y = 0.0174 \cdot X + 0.0238$

En la figura 25 se puede observar que existe relación lineal entre la respuesta y la concentración en el intervalo de 0.050 mg/mL a 0.150 mg/mL (50.0 - 150.0 %), por lo que el sistema es lineal para el Salicilato de metilo.

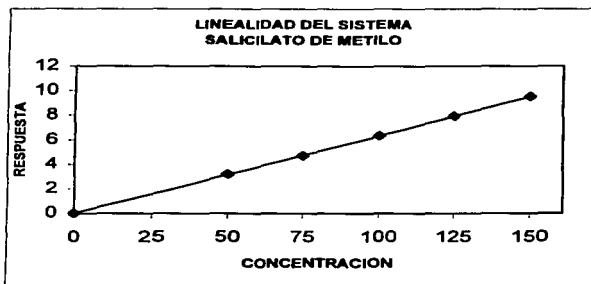


Fig. 25. Linealidad del Sistema para Salicilato de Metilo.

<b>m</b>	0.0633
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9999
<b>r</b>	1.0000
<b>b</b>	0.0126

Ecuación de la recta:  $Y = m x + b$   
 $Y = 0.0633 \cdot X + 0.0126$

### 3.4.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA:

En la tabla 31 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de precisión del sistema para Bencidamina y Salicilato de metilo.



Tabla 31. Resultados de la evaluación de precisión del sistema.

MUESTRA	BD/IND	SM/IND	BD/IND	SM/IND	BD/IND	SM/IND
100-1	1.822608	6.436687	1.851613	6.508381	1.827665	6.476606
100-2	1.820477	6.510055	1.831951	6.503698	1.823463	6.480292
100-3	1.812667	6.456369	1.816047	6.491841	1.812363	6.467238
100-A	1.822627	6.404680	1.825217	6.430697	1.817894	6.452411
100-B	1.813103	6.451986	1.783168	6.328453	1.807047	6.489761
100-C	1.863692	6.596979	1.864787	6.645285	1.801616	6.421271
			<b>BD/IND</b>	<b>SM/IND</b>		
	<b>promedio</b>		1.82	6.48		
	<b>d.e.</b>		0.02	0.07		
	<b>c.v.</b>		1.11	1.07		

De acuerdo al criterio establecido el sistema es preciso a la concentración de 0.0500 mg/mL (Nivel 100 %) para Bencidamina y de 0.100 mg/mL (Nivel 100 %) para Salicilato de metilo.

#### 3.4.4. LINEALIDAD DEL METODO:

En la tabla 32 se presentan los resultados obtenidos de Linealidad del Método para Bencidamina y Salicilato de metilo y en la figura 26 se muestra la gráfica correspondiente. Se puede observar que existe relación lineal entre la respuesta y la concentración en el intervalo de 0.0250mg/mL a 0.075 mg/mL (50.0 -150.0), por lo que el método es lineal para Bencidamina.

Tabla 32. Análisis estadístico para la Linealidad del método.

		<b>BD</b>	<b>SM</b>
<b>50</b>	<b>Promedio</b>	0.02	0.06
	<b>d.e.</b>	1.93E-04	8.84E-04
	<b>c.v.</b>	1.21	1.47
<b>75</b>	<b>Promedio</b>	0.02	0.06
	<b>d.e.</b>	1.95E-04	8.13E-04
	<b>c.v.</b>	1.24	1.32
<b>100</b>	<b>Promedio</b>	0.02	0.06
	<b>d.e.</b>	1.46E-04	4.54E-04
	<b>c.v.</b>	0.92	0.71
<b>125</b>	<b>Promedio</b>	0.02	0.06
	<b>d.e.</b>	1.05E-04	8.26E-04
	<b>c.v.</b>	0.67	1.35
<b>150</b>	<b>promedio</b>	0.02	0.06
	<b>d.e.</b>	1.14E-04	5.62E-04
	<b>c.v.</b>	0.73	0.90

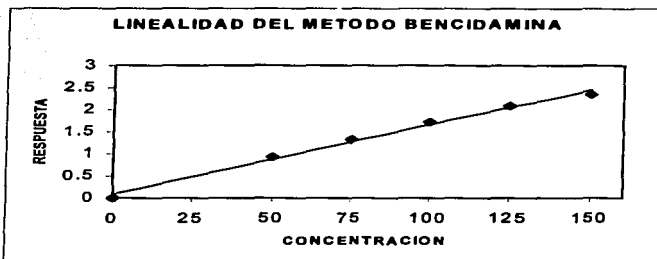


Fig. 26. Linealidad del Método para Bencidamina.

m	0.0154
r <sup>2</sup>	0.9996
r	0.9998
b	0.0329

Ecuación de la recta:  $Y = m x + b$   
 $Y = 0.0154 * X + 0.0329$

En la figura 27 se puede observar que existe relación lineal entre la respuesta y la concentración en el intervalo de 0.050 mg/mL a 0.150 mg/mL (50.0 - 150.0%), por lo que el método es lineal para el Salicilato de metilo.

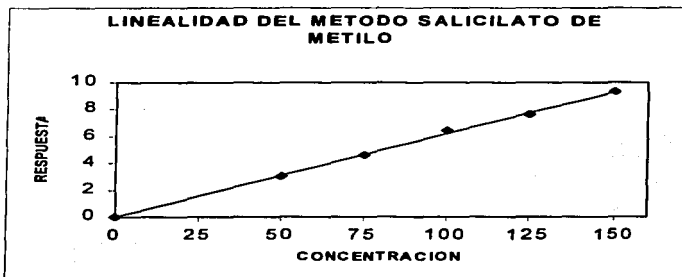


Fig. 27. Linealidad del Método para Salicilato de Metilo.

<b>m</b>	15.9445
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9976
<b>r</b>	0.9988
<b>b</b>	1.0785

Ecuación de la recta:  $Y = m x + b$   
 $Y = 15.9446 \cdot X + 1.0785$

### 3.4.5. EXACTITUD DEL METODO:

Los resultados obtenidos para Bencidamina se muestran en la tabla 33, así como el porcentaje al cual corresponde, considerando la cantidad adicionada. En la figura 28 se muestra la gráfica correspondiente, se puede observar que existe relación lineal entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada en el intervalo de 0.0250mg/mL a 0.075 mg/mL (50.0 -150.0%), con lo que se determina que el método es exacto para Bencidamina.

Tabla 33. Cantidad recuperada de Bencidamina

NIVEL (%)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	BD (%)
0	0	0	0
50	24.9	24.5	98.3328
75	37.1	37.0	98.3638
100	49.4	48.8	98.4564
125	61.6	60.8	98.6592
150	74.1	73.2	98.8433

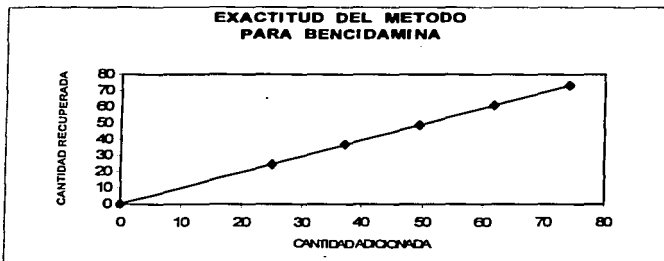


Fig. 28. Exactitud del Método para Bencidamina.

$m$	0,9874
$r^2$	1,0000
$r$	1,0000
$b$	0,0588

Ecuación de la recta:  $Y = m x + b$   
 $Y = 0.9874 * X + 0.0588$

Los resultados obtenidos para Salicilato de metilo se muestran en la tabla 34, así como el porcentaje al cual corresponde, considerando la cantidad adicionada: En la figura 29 se muestra la gráfica correspondiente, se puede observar que existe

relación lineal entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada en el intervalo de 0.050 mg/mL a 0.150 mg/mL (50.0 -150.0%), por lo que el método es exacto para Salicilato de metilo

Tabla 34. Cantidad recuperada de Salicilato de Metilo

NIVEL (%)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	SM (%)
0	0	0	0
50	56.7	57.6	101.7635
75	76.2	77.3	100.9363
100	106.4	104.1	99.9604
125	136.8	138.2	100.8392
150	156.7	156.0	100.5348

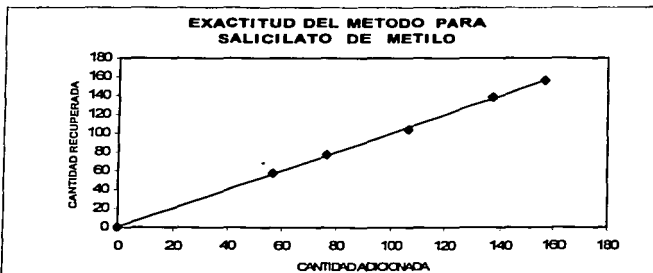


Fig. 29. Exactitud del Método para Salicilato de Metilo.

**m**                    0,9997  
**r<sup>2</sup>**                   0,9994  
**r**                      0,9962  
**b**                      0,4063

Ecuación de la recta:      $Y = m x + b$   
                                       $Y = 0.9962 \cdot X + 0.4063$

Desviación estándar:  
 Bendidamina: 1.5436%                    Salicilato de metilo: 0.0396%

En ambos casos se cumple con los criterios establecidos en los parámetros de la recta y por ciento recuperado así como en el por ciento de desviación entre la cantidad adicionada y la recuperada.

Cantidad recuperada:

Del 98.33 - 98.84 para Bendidamina y 99.96 - 101.76 para Salicilato de metilo.

### 3.4.6. REPRODUCIBILIDAD

En las tablas 35, 36 y 37 se observan los resultados obtenidos para la prueba de reproducibilidad para Bendidamina y Salicilato de metilo.

Analista 1, Día 1.

Tabla 35. Relación de áreas para la reproducibilidad (día 1)

Muestra Inyección	Bd	Bd	Bd	SM	SM	SM
	1	2	3	1	2	3
<b>M11</b>	103.22	102.21	103.28	101.46	99.70	100.50
<b>M12</b>	99.24	105.65	103.63	98.23	99.62	101.01
<b>M21</b>	100.82	101.83	104.48	98.85	98.64	100.21
<b>M22</b>	103.45	100.93	102.81	98.15	97.66	99.63
<b>M31</b>	101.17	103.92	100.08	98.36	100.66	97.45
<b>M32</b>	100.71	103.02	100.64	97.34	97.32	98.16
	<b>BD</b>			<b>SM</b>		
<b>Promedio</b>	102.28			99.05		
<b>d.e.</b>	1.71			1.33		
<b>c.v</b>	1.67			1.34		

Analista 1, Día 2.

Tabla 36. Relación de áreas para la reproducibilidad (día 2)

Muestra Inyección	Bd 1	Bd 2	Bd 3	SM 1	SM 2	SM 3
M11	101.03	98.52	98.72	98.46	95.94	95.59
M12	99.52	98.14	100.23	96.34	96.12	98.23
M21	98.92	100.81	98.18	97.35	97.26	95.47
M22	103.30	99.02	99.26	97.09	96.43	96.18
M31	98.99	100.77	101.10	96.31	98.01	98.60
M32	100.14	102.26	102.54	97.62	99.05	99.10
	BD			SM		
Promedio	100.08			97.17		
d.e.	1.54			1.19		
c.v	1.54			1.22		

Tabla 37. Resultado global de la reproducibilidad.

	BD	SM
Promedio	101.18	98.11
d.e.	1.95	1.57

Se cumple con el criterio establecido para la reproducibilidad, ya que los coeficientes de variación para Bendidamina y Salicilato de metilo son menores al 2.0%

### 3.4.7. TOLERANCIA DEL METODO

En la tabla 38, 39 y 40, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia del método para Bendidamina y Salicilato de Metilo, en las que se observa que la fase móvil con un porcentaje menor de fase orgánica (36 %) presenta una mayor resolución entre el pico del Salicilato de metilo e Indometacina pero mayor coileo en el pico de Bendidamina, además de aumentar el tiempo de corrida hasta 12 minutos.

La fase móvil con el mayor porcentaje de fase orgánica (44 %) reduce el tiempo de corrida hasta 6 minutos así como la resolución entre la señal del Salicilato de metilo e Indometacina.

Con la a fase móvil de 40 % de fase orgánica seleccionada en el estudio se obtiene un tiempo de corrida de 8 minutos, la simetría y coileo del pico de Bendidamina no son muy diferentes a los obtenidos con la fase de menor proporción de fase orgánica (resultados más bajos) y la resolución entre los tres picos es aceptable.

Por lo tanto, el cambio en la proporción de la fase móvil en un +/- 4.0% afecta significativamente la respuesta cromatográfica.

**Tabla 38. Parámetros cromatográficos obtenidos con la fase móvil al 36%.**

<b>36%</b>	<b>Simetría Bd</b>	<b>Resolución 1</b>	<b>Resolución 2</b>	<b>coleo Bd</b>
<b>PROMEDIO</b>	0.40	1.87	4.68	1.34
<b>D.E.</b>	0.07	0.06	0.19	0.20
<b>C.V.</b>	17.56	3.43	4.17	15.33
	<b>Tr BD</b>	<b>Tr SM</b>	<b>Tr Ind</b>	<b>Tiempo de corrida</b>
	3.71 min	5.69 min	11.40 min	12 minutos

**Tabla 39. Parámetros cromatográficos obtenidos con la fase móvil al 40%.**

<b>40%</b>	<b>Simetría Bd</b>	<b>Resolución 1</b>	<b>Resolución 2</b>	<b>coleo Bd</b>
<b>PROMEDIO</b>	0.46	1.97	2.45	1.23
<b>D.E.</b>	0.04	0.06	0.05	0.10
<b>C.V.</b>	9.47	2.95	2.11	7.78
	<b>Tr BD</b>	<b>Tr SM</b>	<b>Tr Ind</b>	<b>Tiempo de corrida</b>
	2.70 min	4.25 min	6.24 min	8 minutos

**Tabla 40. Parámetros cromatográficos obtenidos con la fase móvil al 44%.**

<b>44%</b>	<b>Simetría Bd</b>	<b>Resolución 1</b>	<b>Resolución 2</b>	<b>coleo Bd</b>
<b>PROMEDIO</b>	0.44	1.79	1.42	1.22
<b>D.E.</b>	0.03	0.05	0.04	0.12
<b>C.V.</b>	6.87	2.84	3.02	9.91
	<b>Tr BD</b>	<b>Tr SM</b>	<b>Tr Ind</b>	<b>Tiempo de corrida</b>
	2.34 min	3.63 min	4.66 min	6 minutos

Donde:

Resolución 1: Entre el pico de Bencidamina y Salicilato de metilo.  
 Resolución 2: Entre el pico de Salicilato de metilo e Indometacina.

**3.4.8. ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN DE LA MUESTRA Y DE REFERENCIA.**

En la tabla. 41 se presentan los resultados de % de recobro obtenidos para Bendidamina en la solución de la muestra.

**Tabla 41. Estabilidad de la solución de la muestra de Bendidamina.**

Condición experimental	m1 %	m2 %	m3 %	Promedio %
Análisis inicial	95.99	96.73	94.64	95.78
Soluciones almacenadas durante 24h a Temperatura ambiente	93.42	94.17	95.32	94.31
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	-2.56	-2.56	0.69	-1.48
Soluciones almacenadas durante 24h en refrigeración	92.95	93.60	93.33	93.30
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	3.04	3.12	1.30	2.49
Soluciones almacenadas durante 48h a temperatura ambiente	94.06	93.43	93.56	93.68
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	1.92	3.29	1.08	2.10
Soluciones almacenadas durante 48h en refrigeración	87.44	89.08	89.21	88.58
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	8.55	7.64	5.42	7.21

En la tabla. 42 se presentan los resultados de % de recobro obtenidos para Bendidamina en la solución de referencia.

**Tabla 42. Estabilidad de la solución de referencia para Bendidamina.**

Condición experimental	sr1 %	sr2 %	sr3 %	Promedio %
Análisis inicial	96.52	94.40	93.89	94.93
Soluciones almacenadas durante 24h a Temperatura ambiente	88.24	88.96	87.33	88.18
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	-8.28	-5.43	-6.56	-6.76
Soluciones almacenadas durante 24h en refrigeración	88.43	88.61	93.33	90.13
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	8.09	5.78	0.55	4.81
Soluciones almacenadas durante 48h a temperatura ambiente	86.37	85.77	87.77	86.64
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	10.15	8.63	6.11	8.30
Soluciones almacenadas durante 48h en refrigeración	85.41	86.39	85.65	85.82
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	11.10	8.01	8.23	9.12

En la tabla 43 se presentan los resultados de % de recobro obtenidos para Salicilato de metilo en la solución de la muestra.



Tabla 43. Estabilidad de la solución de la muestra de Salicilato de metilo.

Condición experimental	m1 %	m2 %	m3 %	Promedio %
Análisis inicial	97.23	98.40	99.06	98.23
Soluciones almacenadas durante 24h a Temperatura ambiente	91.19	91.52	92.83	91.85
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	-6.03	-6.88	-6.23	-6.38
Soluciones almacenadas durante 24h en refrigeración	90.94	91.43	90.92	91.10
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	6.28	6.97	8.13	7.13
Soluciones almacenadas durante 48h a Temperatura ambiente	92.64	90.92	91.22	91.60
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	4.58	7.48	7.83	6.63
Soluciones almacenadas durante 48h en refrigeración	88.47	89.55	89.53	89.18
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	8.76	8.85	9.52	9.04

En la tabla. 44 se presentan los resultados de % de recobro obtenidos para Salicilato de metilo en la solución de referencia.

Tabla 44. Estabilidad de la solución de referencia para Salicilato de metilo.

Condición experimental	sr1 %	sr2 %	sr3 %	Promedio %
Análisis inicial	105.71	106.07	103.29	105.02
Soluciones almacenadas durante 24h a Temperatura ambiente	96.93	97.51	95.64	96.69
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	-8.78	-8.56	-7.65	-8.33
Soluciones almacenadas durante 24h en refrigeración	97.96	96.42	98.60	97.66
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	7.75	9.65	4.68	7.36
Soluciones almacenadas durante 48h a Temperatura ambiente	96.58	95.64	94.72	95.65
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	9.13	10.44	8.57	9.38
Soluciones almacenadas durante 48h en refrigeración	95.47	96.69	95.68	95.95
Desviación entre la condición inicial y la ensayada	10.24	9.38	7.60	9.07

Con base en los resultados obtenidos se encontró que la desviación entre la condición inicial y la condición ensayada es mayor al 2.0%, tanto para la solución de la muestra y la solución de referencia de Benclidamina y Salicilato de metilo a un tiempo de 24 horas, por lo que se recomienda analizar las muestras inmediatamente

después de su preparación ya que la concentración de los activos disminuye considerablemente.

### 3.4.9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN LA FASE MOVIL.

En la tabla 45 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad de los principios activos en la fase móvil, en la que se observa que La desviación entre la condición inicial y final es menor al 2.0 % lo cual nos indica que la fase móvil es estable hasta una semana, en refrigeración y en un recipiente perfectamente cerrado.

Tabla 45. Estabilidad de a fase móvil.

Tiempo	0 horas		1 semana	
	BD	SM	BD	SM
Sr1	101,84	101,24	100,78	101,10
	102,81	102,67	101,16	101,65
	103,32	102,73	100,24	99,73
Sr2	99,90	101,20	100,76	100,21
	101,05	103,00	100,45	100,03
	100,25	103,49	98,02	97,39
Sr3	99,27	100,20	98,47	99,09
	101,25	100,47	98,98	99,04
	99,05	98,94	99,25	101,08
PROMEDIO	100,97	101,55	99,79	99,93
tiempo	BD		SM	
0 horas	100,97		101,55	
1 Semana	99,79		99,93	
Desviación	1,18		1,62	

### 3.4.10. LIMITE DE DETECCIÓN:

De acuerdo a la magnitud de la respuesta del blanco (Placebo), se calculó el promedio de las respuestas el cual multiplicado por un factor de 3 dio el estimado del límite de cuantificación.

Salicilato de metilo  
Nivel de ruido: 0.3 AUFS

Bencidamina:  
Nivel de ruido: 0.18 AUFS

El método detecta hasta 0.54 µg/mL de Salicilato de metilo y 0.9 µg/mL de Bencidamina.

### 3.4.11. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN:

De acuerdo a la magnitud de la respuesta del blanco (Placebo), se calculó el promedio de las respuestas el cual multiplicado por un factor de 10 dio el estimado del límite de cuantificación.

Salicilato de metilo  
Nivel de ruido: 0.3 AUFS

Bencidamina:  
Nivel de ruido: 0.18 AUFS

El método cuantifica hasta 1.8 µg/mL de Salicilato de metilo y 3.0 µg/mL de Bencidamina.

El coeficiente de variación es menor al 10.0%

### 3.5. RESULTADO FINAL DE LA VALIDACIÓN DEL METODO ANALITICO

En la tabla 46 al comparar las condiciones y métodos analíticos del estudio anterior y este método, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 46. Condiciones cromatográficas de los tres métodos

EQUIPO	METODO ANTERIOR	METODO ACTUAL
	A	B
Cromatógrafo de líquidos	Beckman System Gold	Beckman System Gold
Inyector	Automático	Automático
Detector	Beckman Gold 166 UV o equivalente a 305 nm	Beckman Gold 166 UV o equivalente a 305 nm
Bomba	126 o equivalente	126 o equivalente
Columna	Novapack C18, de 150 X 3.9 mm, y 5 µm de tamaño de partícula	Novapack C18, de 150 X 3.9 mm, y 5 µm de tamaño de partícula
Flujo	1.0 ml/min	1.0 mL/min
Fase móvil	Acetonitrilo – agua – ác. Acético (50:49.5:0.5)	Acetonitrilo – agua – ác. Acético (40 59:1)
Reactivo par – iónico	Dodecilsulfato de sodio	Trietilamina 60 mM
Vol. Inyección	5 µL	5 µL
Solución de referencia:	40 µg/mL de Bencidamina (Bd), 80 µg/mL de Salicilato de Metilo (SM) y 20 µg/ mL de Indometacina (Ind).	40 µg/mL de Bencidamina (Bd), 80 µg/mL de Salicilato de Metilo (SM) y 20 µg/ mL de Indometacina (Ind).

Cromatogramas:

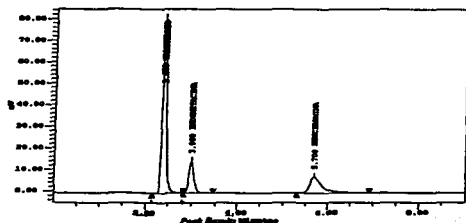


Fig. 30. cromatograma obtenido con el método A

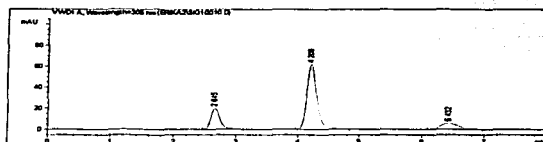


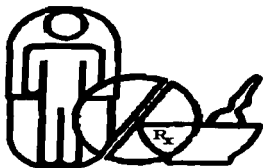
Fig. 31. Cromatograma obtenido con el método B

En la tabla 47 se muestran las diferencias en los valores obtenidos para las respuestas de Coleo BD, Resolución 1, Resolución 2 y tiempo de corrida, al emplear el método anterior y el actual.

Tabla 47. Comparativo de las respuestas analíticas de los tres métodos.

RESPUESTAS ANALITICAS	METODO ANTERIOR	METODO ACTUAL
	A	B
COLREO BD	1.74 (Valor que se quiere disminuir)	1.55
RESOLUCION 1	1.29 (Ind y BD)	2.2 (BD y SM)
RESOLUCION 2	4.61	2.81
TIEMPO DE CORRIDA	8	8

De acuerdo a los resultados anteriores, se observa que con el método analítico desarrollado se disminuye el coleo de la Bencidamina a 1.55, es decir se disminuye 0.19 en comparación al método analítico inicial en el cual se tenía un valor de 1.74.



**Biofarmacia**

***CAPITULO V  
CONCLUSIONES***

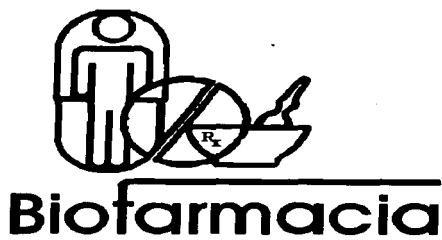
## CONCLUSIONES

El método para determinar Bencidamina y Salicilato de metilo en un gel, es preciso, exacto y lineal en el intervalo de concentración de 20 a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Bencidamina y de 40 a 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para Salicilato de metilo (50 - 150 %). Las muestras son estables a un tiempo menor de 24 horas en refrigeración o temperatura ambiente.

El método es selectivo ya que en los cromatogramas obtenidos, no se observa interferencia debida a los productos de degradación.

El método implementado es sencillo y rápido, ya que no requiere de un tratamiento complicado de la muestra para poder extraer los principios activos.

Se logro la disminución del coleo en el pico de Bencidamina donde el valor final es menor que el obtenido al trabajar con el método descrito anteriormente, dándonos una opción alterna de trabajo más económica.



**CAPITULO VI**  
**APENDICES**

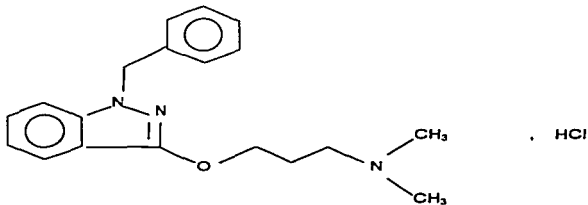
**APENDICE I: PRINCIPIOS ACTIVOS****APENDICE II. REACTIVOS, EQUIPO Y PREPARACION DE SOLUCIONES****APENDICE III. CROMATOGRAMAS****APENDICE I****PRINCIPIOS ACTIVOS.<sup>10,13</sup>****BENCIDAMINA:**

N,N, Dimetil-3-[[1-(fenilmetil)-1H-indazol-3-il]oxy]-1-propanamina

1-bencil-3-[3-(dimetilamino) propoxi]-1H-indazol

1-bencil-1H- indazol-3-il 3-(dimetilamino) propil éter

Bencidamina.



$C_{19}H_{23}N_3O$  ; PM : 309.41. C 73.76%, H 7.49%, N 13.58%, O 5.17%. P.eb<sub>0.05</sub> : 160°

**CLORHIDRATO DE BENCIDAMINA<sup>10</sup>:**

3-(1-Bencil-indazol-3-iloxi) propildimetilamina clorhidrato. Contiene no menos de 99.0 % y no más de 101.0% de  $C_{19}H_{23}N_3O, HCl$ , calculado en base seca.

PM: 345.9, CAS: 132-69-4

Características: Polvo cristalino blanco Soluble en agua; poco soluble en etanol y cloroformo, prácticamente insoluble en eter.<sup>10</sup>



P.f.:160°. UV máx: 306 nm (E<sup>1%</sup><sub>1cm</sub> 160). LD<sub>50</sub> en ratón, rata (mg/kg): 110,100 i.p.:515, 1050 oral.<sup>13</sup>

Disposición en el cuerpo: Después de una administración oral, cerca del 50% de la dosis es excretada inalterada en orina.<sup>13</sup>

Concentración terapéutica: Una dosis oral de 1 mg/kg produce una concentración aprox. De 0.8 µg/ mL en 2 horas y una concentración significativa se mantiene durante varias horas.<sup>13</sup>

Unión a proteínas: Una fracción de Bendidamina se une a proteínas en la sangre.

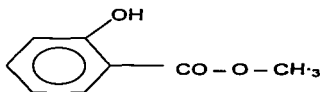
Dosis: 150 a 200 mg de clorhidrato de Bendidamina diariamente.

Uso terapéutico: Analgésico, anti-inflamatorio, antipirético.<sup>13</sup>

Identificación: Espectro de absorción infrarrojo (IR), el cual es similar al espectro IR de la sustancia de referencia de clorhidrato de Bendidamina.

### SALICILATO DE METILO<sup>10,13</sup>:

Metil 2-hidroxibenzoato



C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, PM: 152.1, CAS: 119-36-8

Líquido ligeramente amarillo. Densidad relativa 1.180 a 1.186. p.eb: 221°, con poca descomposición. Índice de refracción. 1.535 a 1.538.

Contiene no menos de 99.0% m/m y no más de 100.5 % de metil 2-hidroxibenzoato.

Ligeramente soluble en agua; miscible con etanol (90%) y con más disolventes orgánicos.<sup>10</sup>

Identificación: Una solución saturada de salicilato de metilo en contacto con una solución de cloruro férrico desarrolla un color violeta.

Disposición en el cuerpo: Pobremente absorbido por la piel intacta; absorbido después de una ingestión oral. Es completamente hidrolizado a ácido salicílico.

**Toxicidad:** El salicilato de metilo es más tóxico que el ácido salicílico. La muerte puede ocurrir en niños después de la ingestión de 4 mL, y dosis de 30 mL son usualmente fatales en adultos.<sup>13</sup>

**Uso:** En ungüentos tópicos y formas sin agua.

## APENDICE II. REACTIVOS, EQUIPO Y PREPARACION DE SOLUCIONES

### REACTIVOS:

Bencidamina, clorhidrato (sustancia de referencia)\*

Salicilato de metilo (sustancia de referencia)\*

Trietilamina R.A. J.T. Baker

Acetonitrilo HPLC Omnisolv

Acido acético glacial R.A. J.T. Baker

Indometacina (sustancia de referencia)\*

\*Donados por Laboratorios Farmacéuticos

### EQUIPO Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Cromatógrafo de líquidos	Beckman System Gold
Inyector	Automático
Detector	Beckman Gold 166 UV o equivalente a 305 nm
Bomba	126 o equivalente
Columna	Novapack C18, de 150 X 3.9 mm, y 5 µm de tamaño de partícula
Flujo	1 ml/min
Fase móvil	Acetonitrilo – agua – ác. acético
Reactivo par – iónico	Trietilamina (TEA) 60mM
Vol. Inyección	5 µL

### PREPARACION DE SOLUCIONES:

*Solución de acetonitrilo:agua (90:10 v/v) para extracción:*

Mezclar por cada 100 mL de solución, 90 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua destilada.

*Solución de Acetonitrilo: agua (60:40 v/v) para extracción:*

Mezclar por cada 100 mL de solución, 60 mL de acetonitrilo y 40 mL de agua destilada.

**Fase móvil: ACN:H<sub>2</sub>O: HCOOH (40:59:1) TEA= 60 mM**

En un matraz erlenmeyer de 100 mL, adicionar 400 mL de acetonitrilo HPLC, 590 mL de agua destilada, 10 mL de ácido acético glacial, y adicionar 6.072 g (4950 µL) de trietilamina, mezclar, filtrar a través de membrana de 0.45 µm, desgasificar en baño de ultrasonido y vacío durante 15 minutos.

*Solución de referencia:*

En un matraz volumétrico de 25 mL, pesar aproximadamente con exactitud 50 mg de Bencidamina sustancia de referencia, adicionar 5 mL de la solución acetonitrilo: agua (90:10) y disolver, pesar en el mismo matraz aproximadamente con exactitud 100 mg de Salicilato de metilo sustancia de referencia, adicionar 2 mL de la solución del estándar interno, llevar a volumen con la misma solución. Transferir una alícuota de 2 mL a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con solución Acetonitrilo: Agua (60:40). Preparar por duplicado. Concentración aproximada: 40 µg/mL de Bencidamina, 80 µg/mL de Salicilato de metilo y 20 µg/mL de Indometacina.

*Solución del estándar interno.*

En un matraz volumétrico de 50 mL pesar 0.625 g de Indometacina y llevar a volumen con solución Acetonitrilo: agua (90:10). Concentración Indometacina: 12.5 mg/mL.

*Solución de la muestra:*

Pesar 1.0 g de gel (0.050g de Bencidamina y 0.100 g de Salicilato de metilo) en un matraz volumétrico de 25 mL, disolver con la solución acetonitrilo: Agua (90:10), adicionar 2 mL de la solución del estándar interno, llevar a volumen con la misma solución (sol. A). Agitar en vortex 30 segundos. Transferir una alícuota de 2 mL a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con solución acetonitrilo: Agua (60:40) (sol. B). Concentración aproximada. 40 µg/mL de Bencidamina, 80 µg/mL de Salicilato de metilo y 20 µg/mL de indometacina.

**Solución stock de Bencidamina (500 µg/mL):**

Pesar 50 mg del estándar de Bencidamina, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al volumen con solución de extracción ACN:H<sub>2</sub>O (60:40).

**Solución stock de Salicilato de metilo (1000 µg/mL):**

Pesar 100 mg del estándar de Salicilato de metilo, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al volumen con solución de extracción (60:40).

**Solución del estándar interno (500 µg / mL) :**

Pesar 50 mg de indometacina, transferir y llevar a volumen en un matraz volumétrico de 100 mL con fase de extracción ACN:H<sub>2</sub>O (60:40).

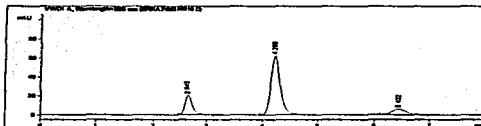
**APENDICE III. CROMATOGRAMAS**

**SELECTIVIDAD**

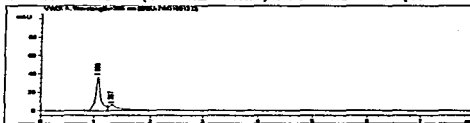
A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos durante la evaluación de la selectividad del método:



**Cromatograma 1**  
Fase móvil utilizada en el método.



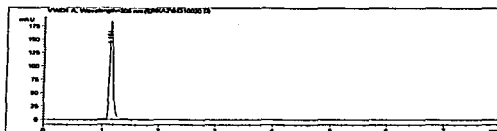
**Cromatograma 2**  
Solución de referencia, la cual contiene Bencidamina ( $Tr = 2.645$  min),  
Salicilato de metilo ( $Tr = 4.209$  min) e indometacina ( $Tr = 6.432$  min).



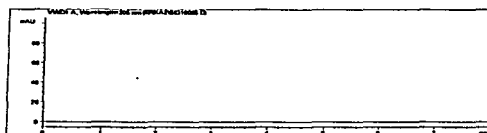
**Cromatograma 3**  
Muestra Blanco de NaOH, se presentan dos señales  
( $Tr = 1.068$  min y  $1.307$  min) que corresponden a la NaOH.



**Cromatograma 4**  
Muestra Blanco de HCl, Se presenta una señal  
( $Tr = 1.100$  min) la cual corresponde al HCl.



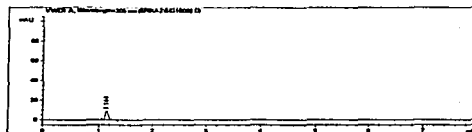
Cromatograma 5  
Muestra Blanco de  $H_2O_2$ , se presenta una señal  
( $T_r=1.151$  min) la cual corresponde al  $H_2O_2$ .



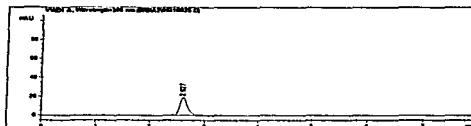
Cromatograma 6  
Muestra Placebo en medio básico (NaOH)



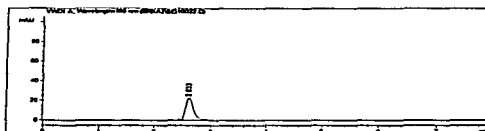
Cromatograma 7  
Muestra Placebo en medio ácido (HCl)



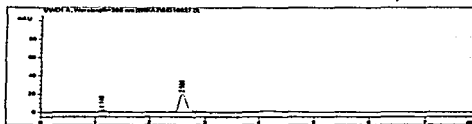
Cromatograma 8  
Muestra Placebo en medio oxidante ( $H_2O_2$ )



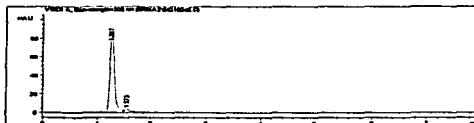
**Cromatograma 9**  
Bencidamina en medio básico (NaOH), Tr = 2.627min.



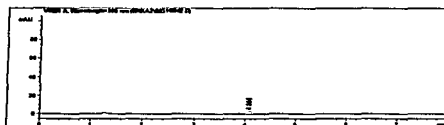
**Cromatograma 10**  
Bencidamina en medio ácido (HCl) Tr = 2.633 min.



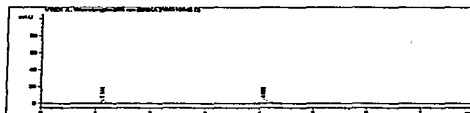
**Cromatograma 11**  
Bencidamina en medio oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Tr=2.586



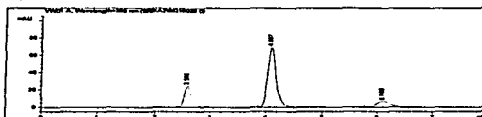
**Cromatograma 12**  
Salicilato de metilo en medio básico (NaOH). Tr = 1.267 min.



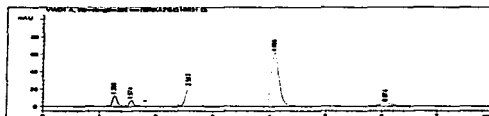
**Cromatograma 13**  
Salicilato de metilo en medio ácido (HCl) Tr=4.080 min



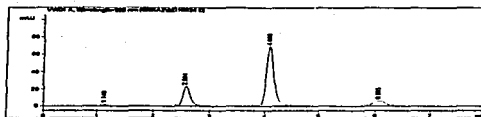
**Cromatograma 14**  
Salicilato de metilo en medio oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Tr=4.095 min



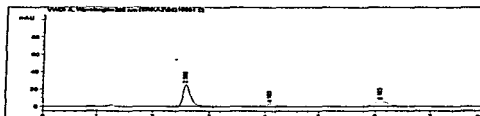
**Cromatograma 15**  
Bencidamina\* Tr = 2.586 min, con Salicilato de metilo Tr = 4.097 min  
e Indometacina Tr = 6.100 min en medio oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



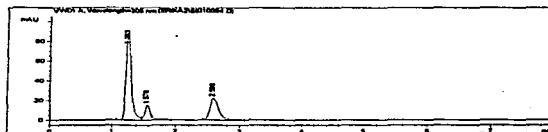
**Cromatograma 16**  
Bencidamina\* Tr = 2.586 min, con Salicilato de metilo Tr = 4.097 min  
e Indometacina Tr = 6.100 min en medio ácido (HCl)



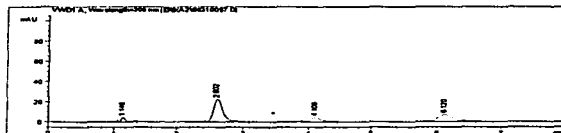
**Cromatograma 17**  
 Bendidamina\* Tr = 2.584 min, con Salicilato de metilo Tr = 4.086 min  
 e Indometacina Tr = 6.065 min en medio básico (NaOH)



**Cromatograma 18**  
 Salicilato de metilo\* Tr = 4.103 min, con Bendidamina Tr = 2.596 min  
 e Indometacina Tr = 6.103 min en medio ácido (HCl)



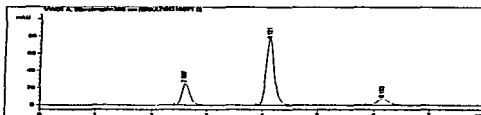
**Cromatograma 19**  
 Salicilato de metilo\* Tr = 1.263 min, con Bendidamina Tr = 2.596 min  
 en medio básico (NaOH)



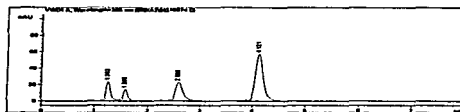
**Cromatograma 20**  
 Salicilato de metilo\* Tr = 4.109 min, con Bendidamina Tr = 2.602 min  
 e Indometacina Tr = 6.120 min en medio oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

TESIS NO CALIFICADA  
 EN FARMACIA

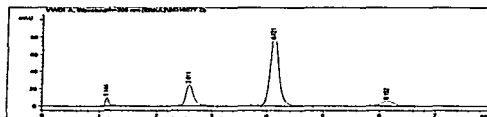




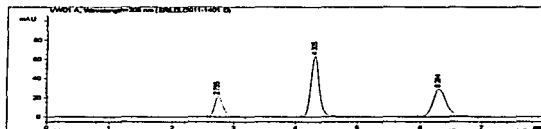
**Cromatograma 21**  
 Placebo\*, con Bencidamina Tr = 2.67 min, Salicilato de metilo Tr = 4.121 min  
 e Indometacina Tr = 6.153 min en medio ácido (HCl)



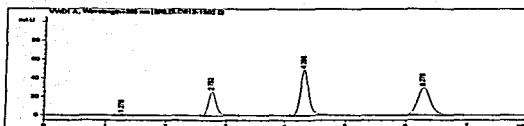
**Cromatograma 22**  
 Placebo\*, con Bencidamina Tr = 2.608 min, Salicilato de metilo Tr = 4.121 min  
 en medio básico (NaOH)



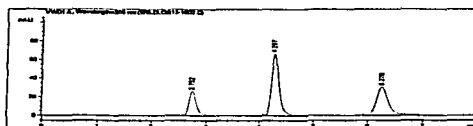
**Cromatograma 23**  
 Placebo\*, con Bencidamina Tr = 2.11 min, Salicilato de metilo Tr = 4.121 min e Indometacina  
 Tr = 6.152 min en medio oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



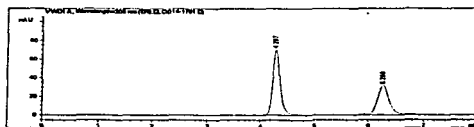
**Cromatograma 24**  
 Bencidamina\* a 40°C Tr = 2.755 min, con Salicilato de metilo Tr = 4.305 min  
 e Indometacina Tr = 6.294 min



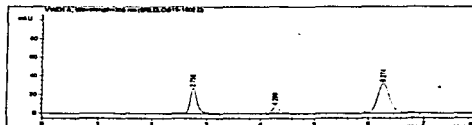
**Cromatograma 25**  
 Salicilato de metilo\* a 40°C Tr = 4.298 min, con Benzydamina Tr = 2.752 min  
 e Indometacina Tr = 6.278



**Cromatograma 26**  
 Placebo\* a 40°C con Benzydamina Tr=2.752 min, Salicilato  
 de metilo Tr=4.297 min e Indometacina Tr=6.270 min

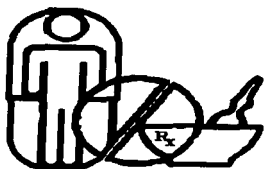


**Cromatograma 27**  
 Benzydamina\* a 80°C con Salicilato  
 de metilo Tr=4.297 e Indometacina Tr=6.268 min



**Cromatograma 28**  
 Salicilato de metilo\* a 80°C Tr=4.299 min, con  
 Benzydamina Tr=2.756 min, e Indometacina Tr=6.274 min

\*Principio activo degradado



**Biofarmacia**

***CAPITULO VII  
BIBLIOGRAFIA***

## BIBLIOGRAFIA

1. Skoog, A. D., West M. D.; "Capítulo 26: Introducción a los métodos cromatográficos", en *Análisis Instrumental*. Nueva Editorial Interamericana, 1991.
2. Willard H., Merritt L. L., Dean A. J.; *Métodos Instrumentales de análisis*. Compañía Editorial Continental. México 1981.
3. Haddad R. P., Jackson E. P.; *Ion Chromatography. Principles and applications*. Journal of Chromatography Library. Vol 46, 1990.
4. *Validation of Chromatographic Methods*. Reviewer Guidance. Center for Drugs Evaluation and Research (CDER). Nov. 1994
5. *Guía de validación de métodos analíticos*. Comisión de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB's, A.C. 2002.
6. *United States Pharmacopoeia XXIII*. NF 18. 1995
7. Mant T. C.; *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and proteins*. CRC Press; USA; 191
8. Oi-Wah L.; Shiu-Fai L., Wai-Chu W.; *Simultaneous Determination of Methyl Salicylate and Thymol in Various Pharmaceutical Formulations by Differential-pulse Voltammetry Using a Glassy Carbon Electrode*. *Analyst*, 1988, 113, p.856-868.
9. Sapio P. J., Sethachutkul K., Moody E. J.; *Simultaneous GLC Determination of Methyl Salicylate and Menthol in a Topical Analgesic Formulation*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol.68, no.4, April 1979.
10. Saad S. M. H., Hamada M.A.; *Liquid Membrane Electrode for Selective Determination of Salicylate in Pharmaceutical Preparations*. *Analyst*, November 1988, Vol. 113.p.1709.
11. *British Pharmacopoeia 1998*, p. 1512.1511,160,161,874,875,S14.
12. ICH Topic Q 2 B . *Validation of Analytical Procedures methodology*. 1996.
13. Montgomery C. D.; *Diseño y análisis de experimentos*. Tercera Edición. Grupo Editorial Iberoamericana. México 1991.
14. Swartz M. E., Krull I. S., Dekker M.I.; *Analytical Method Development and Validation*, Inc. New York. Basel. Hong Kong 1997
15. *The Index Merck and encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 12<sup>th</sup> Edition, Merck&Co., Inc, 1996.
16. Massart L. D., Dijkstra A., Kaufman L.; *Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures*. Part V Systems Approach in Analytical Chemistry. Elsevier Scientific Publishing Company. 1978.

17. Clarke E.G.C.; *Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material*. Second Edition. London Pharmaceutical p.1969.
18. Herbert L. A., Rieger M. M., Banker S. G.; *Pharmaceutical Dosage Forms. Disperse Systems*. Vol.2. Marcel Dekker, Inc. 1989.
19. Lachman L., Lieberman H. A., Kanig L. J.; *The theory and Practice of Industrial Pharmacy*. Lea & Febiger 1986. Philadelphia 1986.
20. Rodríguez S. R., Ramos M. C., Vertiz H. J., Romero N. L., Fuentes S. H., González de la P. M.; *Enseñanza del diseño factorial a través de experimentos sencillos de laboratorio*. Revista Mexicana de Ciencia Farmacéuticas. Vol. 30. No. 4 Oct - Dic 1999. P. 16-21.
21. Montgomery C.D.; *Introducción al Diseño de experimentos*. Curso 102. Statical Productivity Consultants. Arizona State University. 1992 SPC
22. Massart L. D., Dijkstra A., Kaufman L.; *Systems Approach in Analytical Chemistry*. Elseiver Scientific Publishing Company. Amsterdam-Oxford-New York 1978.
23. Stevens H.M., Gill R.; *High-Performance Liquid Chromatography systems for the Analysis of Analgesic and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Forensic Toxicology*. Journal of Chromatography, 370 (1986) 39-47.
24. Bartha A., Vigh G.; *Basis of the Rational Selection of the Hydrophobicity and Concentration of the Ion-pairing Reagent in Reversed-phase ion-pair High-performance Liquid Chromatography*. Journal of Chromatography, 499 (1990) 423-434.
25. Mulholland M., Waterhouse J.; *Development and Evaluation of an Automated Procedure for the Ruggedness Testing of Chromatographic Conditions in High-performance Liquid Chromatography*. Journal of Chromatography, 395 (1987) 539-551.
26. Reynolds J., *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*. Royal Pharmaceutical Society 1996.
27. *USP Dictionary of USAN and International Drug Names 1996*. United States Pharmacopeial Convention, Inc