



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DEL METODO ANALITICO UTILIZADO PARA LA
CUANTIFICACION DE FOMINO BEN (PRINCIPIO ACTIVO),
METILPARABENO Y PROPILPARABENO (CONSERVADORES)
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN
EN UNA SUSPENSION ORAL.

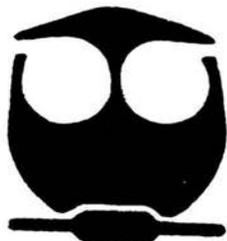
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

AUREA ISABEL SEGURA GALLEGOS



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 : Q.F.B. María Luisa García Padilla
Vocal : Dra. Helgi Helen Jung Cook
Secretario : M. en C. Ricardo Rodríguez Saenz
1er. Suplente : M. en C. Juan Manuel Rodríguez
2do. Suplente : M. en C. María de Lourdes Cervantes Ayala

Lugar donde se desarrollo el tema: Laboratorio Boehringer Ingelheim Promeco, ubicado en Calle Maíz No. 49 Col. Barrio Xaltocan.

Asesor del tema:



Dra. Helgi Helen Jung Cook

Supervisor Técnico:



Q.F.B. Olga González Castán

Sustentante:



Aurea Isabel Segura Gallegos

Con mucho cariño dedico y agradezco este trabajo a:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Alma Mater, es un privilegio ser parte de una Institución tan noble.

¡ Por mi raza hablará el espíritu !

A la Facultad de Química y sus profesores, porque en sus aulas logré mi formación profesional.

A mis padres, porque es logro de los tres. Gracias por enseñarme a ser fuerte para enfrentar las adversidades, por sus consejos y apoyo.

¡ Los adoro !

A mis hermanos, por crecer conmigo, por compartir todas y cada una de mis experiencias.
¡ Siempre Juntos !

A Dios por haberme dado la vida, por su amor infinito, por las bendiciones que me da, porque lo que soy, he sido y seré es gracias a él.

A Rubiel porque siempre estuviste conmigo apoyándome y luchando para lograr este sueño.
¡ Gracias !

A la Familia Tinoco por permitirme compartir un sin fin de emociones y vivencias que me ayudaron a ser mejor persona.

A mis amigas y amigos por los momentos compartidos que nos permitieron crecer y aprender juntos.

A mi asesora de tesis, la Dra. Helgi Jung Cook; a la profesora Q.F.B. Ma. Luisa García Padilla, M.C. Ricardo Rodríguez Saenz, M.C. Juan Manuel Rodríguez, M.C. Ma. de Lourdes Cervantes, por su apoyo e interés para elaboración de este trabajo.

A Lupita por compartir tardes de innumerables experimentos, sus conocimientos y lo más valioso: su amistad.

¡ Gracias !

A PROMECO por creer en mí y darme el apoyo necesario para elaborar este trabajo. A mis compañeros de trabajo por ser parte de mi vida.

Para todos mis familiares que de alguna u otra forma contribuyeron para que hoy este trabajo sea una realidad.

“Porque ser Universitario significa mucho más que concluir una carrera”

INDICE GENERAL

	Pág.
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO	1
CAPÍTULO 2. GENERALIDADES	3
2.1. Monografía de Fominoben	3
2.1.1. Propiedades Físicoquímicas	3
2.1.2. Farmacocinética y mecanismo de acción	4
2.1.3. Aplicaciones Terapéuticas	6
2.1.4. Precauciones	7
2.2. Monografía de Metilparabeno	7
2.2.1. Propiedades Físicoquímicas	8
2.3. Monografía de Propilparabeno	8
2.3.1. Propiedades Físicoquímicas	9
2.4. Validación de Métodos Analíticos	10
2.4.1. Linealidad	11
2.4.2. Intervalo	11
2.4.3. Exactitud	11
2.4.4. Precisión	11
2.4.5. Reproducibilidad	11
2.4.6. Repetibilidad	12
2.4.7. Precisión intermedia	12
2.4.8. Especificidad (Selectividad)	12
2.4.9. Límite de detección	12
2.4.10. Límite de Cuantificación	12
2.4.11. Tolerancia	12
2.4.12. Robustez	13
2.4.13. Estabilidad de la muestra	13
2.4.14. Adecuabilidad del sistema	13
CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL	14
3.1. Método Analítico por Cromatografía de Líquidos (CLAR) para cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en una suspensión oral.	15
3.1.1. Reactivos, equipo y materiales	15
3.1.2. Preparación de Soluciones	16
3.1.2.1. Preparación de soluciones para fase móvil	16
3.1.2.2. Preparación de soluciones de referencia	17
3.2.2.3. Preparación de la curva patrón	17
3.1.3. Método analítico para cuantificar fominoben en la suspensión oral.	18
3.2. Validación del método analítico por CLAR para cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en una suspensión oral.	19
3.2.1. Adecuabilidad del sistema	20
3.2.2. Especificidad	20
3.2.3. Linealidad del sistema	21

3.2.4. Exactitud del método	21
3.2.5. Precisión del método (Repetibilidad)	23
3.2.6. Reproducibilidad (Precisión intermedia)	23
3.2.7. Límite de detección y cuantificación	23
3.2.8. Tolerancia	24
3.2.8.1. Cambios en la proporción de la fase móvil	25
3.2.8.2. Cambio de columna	25
3.2.8.3. Cambio de filtros	25
3.2.9. Estabilidad de muestras de producto terminado y soluciones de referencia.	26
3.2.10. Estabilidad de la fase móvil.	26
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
4.1. Especificidad del método analítico	27
4.2. Linealidad del sistema para Fominoben, metilparabeno y propilparabeno.	27
4.3. Exactitud para Fominoben, metilparabeno y propilparabeno.	34
4.4. Precisión del método (Repetibilidad) para Fominoben, metilparabeno y propilparabeno.	37
4.5. Reproducibilidad (Precisión Intermedia) para Fominoben, metilparabeno y propilparabeno.	38
4.6. Límite de detección y cuantificación de Fominoben, metilparabeno y propilparabeno.	41
4.7. Tolerancia para fominoben, metilparabeno y propilparabeno.	43
4.7.1. Influencia del cambio en la proporción de la fase móvil.	43
4.7.2. Influencia del cambio en el método para cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión oral.	44
4.7.3. Influencia del cambio de filtros utilizados para cuantificar, fominoben, metilparabeno y propilparabeno.	43
4.8. Estabilidad de las soluciones de referencia y de las soluciones de las muestras de producto terminado.	46
4.9. Estabilidad en la fase móvil.	49
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	51
CAPITULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	53
APÉNDICE A. Formulas utilizadas para el calculo del límite de detección y el límite de cuantificación.	55
APÉNDICE B. Cromatogramas resultantes de la validación del método analítico para cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en una suspensión oral.	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Estructura química de Fominoben (Principio Activo) 3
Figura 2	Metabolitos de fominoben 5
Figura 3	Estructura química de Metilparabeno (Conservador) 8
Figura 4	Estructura química de Propilparabeno (Conservador) 9
Figura 5	Diagrama de flujo de la parte experimental 14
Figura 6	Grafica de Linealidad del sistema para Fominoben 29
Figura 7	Grafica de Linealidad del sistema para Metilparabeno 31
Figura 8	Grafica de Linealidad del sistema para Propilparabeno 33
Figura 9	Cromatograma de Blanco 56
Figura 10	Cromatograma de Fase Móvil 56
Figura 11	Cromatograma de solución de Referencia al 100% 57
Figura 12	Cromatograma de solución de muestra del producto 57
Figura 13	Cromatograma de solución de la solución de referencia al 100% sometida a condiciones de Baño María 58
Figura 14	Cromatograma de la solución de referencia al 100% sometida a condiciones de luz U.V. 58
Figura 15	Cromatograma de la solución de referencia al 100% adicionada con HCl 1 N 59
Figura 16	Cromatograma de la solución de referencia al 100% adicionada con NaOH 1 N 59
Figura 17	Cromatograma de la solución de referencia al 100% adicionada con H ₂ O ₂ 60
Figura 18	Cromatograma del placebo de la suspensión oral 60
Figura 19	Cromatograma del placebo sometido a condiciones de Baño María 61
Figura 20	Cromatograma del placebo sometido a condiciones de luz U.V. 61
Figura 21	Cromatograma del placebo adicionado con HCl 1 N 62
Figura 22	Cromatograma del placebo adicionado con NaOH 1 N 62
Figura 23	Cromatograma del placebo adicionado con H ₂ O ₂ 63
Figura 24	Cromatograma de la solución de la muestra del producto sometida a condiciones de Baño María 63
Figura 25	Cromatograma de la solución de la muestra del producto sometida a condiciones de luz U.V. 64
Figura 26	Cromatograma de la solución de la muestra del producto adicionada con HCl 1 N 64
Figura 27	Cromatograma de la solución de la muestra del producto adicionada con NaOH 1 N 65
Figura 28	Cromatograma de la solución de la muestra del producto adicionada con H ₂ O ₂ 65
Figura 29	Cromatograma de la fase móvil de buffer sorensen-acetonitrilo 50:50 66
Figura 30	Cromatograma de la fase móvil de buffer Sorensen-acetonitrilo 70:30 66

Figura 31	Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 5% de la cantidad teórica	67
Figura 32	Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 10% de la cantidad teórica	67
Figura 33	Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 20% de la cantidad teórica	68
Figura 34	Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 25% de la cantidad teórica	68
Figura 35	Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 30% de la cantidad teórica	69
Figura 36	Cromatograma de la prueba de confirmación del Límite de Cuantificación encontrado	69
Figura 37	Cromatograma del placebo cargado con 80 % de la concentración teórica del principio activo y de los conservadores contenidos en la suspensión oral	70
Figura 38	Cromatograma del placebo cargado con 100 % de la concentración teórica del principio activo y de los conservadores contenidos en la suspensión oral	70
Figura 39	Cromatograma del placebo cargado con 120 % de la concentración teórica del principio activo y de los conservadores contenidos en la suspensión oral	71

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Linealidad del Sistema para Fominoben	28
Tabla 2	Linealidad del Sistema para Metilparabeno	30
Tabla 3	Linealidad del Sistema para Propilparabeno	32
Tabla 4	Exactitud del método para Fominoben	34
Tabla 5	Exactitud del método para Metilparabeno	35
Tabla 6	Exactitud del método para Propilparabeno	36
Tabla 7	Precisión del método para Fominoben, Metilparabeno y Propilparabeno	37
Tabla 8	Reproducibilidad del método para Fominoben	38
Tabla 9	Reproducibilidad del método para Metilparabeno	39
Tabla 10	Reproducibilidad del método para Propilparabeno	40
Tabla 11	Límite de detección y cuantificación para Fominoben	41
Tabla 12	Límite de detección y cuantificación para Metilparabeno	42
Tabla 13	Límite de detección y cuantificación para Propilparabeno	42
Tabla 14	Influencia del cambio en la Proporción de la fase móvil para Fominoben, Metilparabeno y Propilparabeno	43
Tabla 15	Influencia del cambio de columna en el método para cuantificar Fominoben, Metilparabeno y Propilparabeno	44
Tabla 16	Tolerancia. Cambio en el tipo de filtros para Fominoben	45
Tabla 17	Tolerancia. Cambio en el tipo de filtros para Metilparabeno	45
Tabla 18	Tolerancia. Cambio en el tipo de filtros para Propilparabeno	45
Tabla 19	Tolerancia. Cambio en el tipo de filtros, comparación	46
Tabla 20	Estabilidad de estándares y muestras a temperatura ambiente para Fominoben	46
Tabla 21	Estabilidad de estándares y muestras a temperatura ambiente para Metilparabeno	46
Tabla 22	Estabilidad de estándares y muestras a temperatura ambiente para Propilparabeno	47
Tabla 23	Estabilidad de estándares y muestras en refrigeración para Fominoben	47
Tabla 24	Estabilidad de estándares y muestras en refrigeración para Metilparabeno	47
Tabla 25	Estabilidad de estándares y muestras en refrigeración para Propilparabeno	47
Tabla 26	Estabilidad de estándares y muestras a temperatura ambiente para Fominoben (12 h.)	48
Tabla 27	Estabilidad de estándares y muestras a temperatura ambiente para Metilparabeno (12 h.)	48
Tabla 28	Estabilidad de estándares y muestras a temperatura ambiente para Propilparabeno (12 h.)	48
Tabla 29	Estabilidad de estándares y muestras en refrigeración para Fominoben (12 h.)	48
Tabla 30	Estabilidad de estándares y muestras en refrigeración para Metilparabeno (12 h.)	48

Tabla 31	Estabilidad de estándares y muestras en refrigeración para Propilparabeno (12 h.)	48
Tabla 32	Estabilidad de la fase móvil a temperatura ambiente para Fominoben	49
Tabla 33	Estabilidad de la fase móvil a temperatura ambiente para Metilparabeno	49
Tabla 34	Estabilidad de la fase móvil a temperatura ambiente para Propilparabeno	49
Tabla 35	Estabilidad de la fase móvil en refrigeración para Fominoben	50
Tabla 36	Estabilidad de la fase móvil en refrigeración para Metilparabeno	50
Tabla 37	Estabilidad de la fase móvil en refrigeración para Propilparabeno	50

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes los éticos, por lo que si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es el paciente.

Los métodos analíticos constituyen "un sistema crítico en el aseguramiento de calidad de una empresa farmacéutica, ya que impactan de manera directa en la calidad del producto".⁴

Desde hace años existe una serie de métodos analíticos para la cuantificación de principios activos, sin embargo, dado que la tecnología avanza y los equipos van siendo cada día más sensibles y específicos, en muchas ocasiones, es necesario hacer modificaciones para contar con un método analítico vigente.

El fominoben es un fármaco indicado en el tratamiento de la tos seca, irritante, en la tos del fumador y en el tratamiento postoperatorio donde otros antitusivos están contraindicados. Se ha demostrado que el fominoben en suspensión es un medicamento que al emplearse no provoca riesgo de habituación o adicción, así mismo en la actualidad sólo existe este producto en presentación de suspensión oral.

El Laboratorio Boehringer Ingelheim Promeco desarrolló un método analítico para cuantificar fominoben en la forma farmacéutica de suspensión oral. Este método no es farmacopeico y además, consultando en la bibliografía y en los antecedentes sobre este principio activo, se encontró que no aparecen publicados métodos para la cuantificación del fominoben, por lo que es importante realizar la validación de este método analítico, ya que debe ser lo suficientemente sensible para permitir la cuantificación del fominoben, en forma confiable.

Con base en lo anterior, se llevo a cabo el presente trabajo cuyo objetivo fue:

Validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para cuantificar el principio activo fominoben, así como los conservadores metilparabeno y propilparabeno, presentes en una suspensión oral que contiene 1.6 g de fominoben, 0.080 g de metilparabeno y 0.020 g de propilparabeno en 100 mL de suspensión.

Capítulo 2

GENERALIDADES

2.1. Monografía de Fominoben. ¹

Nombre Químico:

- ★ N-[3-cloro-2-[[metil-[2-(4-morfolinil)-2-oxoetil]amino]metil]fenil]benzamida
- ★ 3'-cloro- α -[metil[(morfolinocarbonil)metil]amino]-o-benzotoluidido
- ★ 3'-cloro- β -[N-metil-N-[(morfolinocarbonil)metil]aminometil]benzalinida

Fórmula Condensada: $C_{21}H_{24}ClN_3O_3$

Estructura:

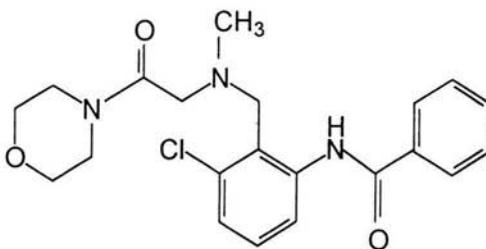


Figura 1. Estructura química del Fominoben

Masa Molecular: 401.89 g/mol

Punto de fusión: 122.5 - 123 °C

2.1.1. Propiedades Fisicoquímicas.

Descripción: Polvo cristalino blanco, prácticamente inodoro y amargo.

Solubilidad: Muy soluble en disolventes orgánicos, así 100 mg se disuelven en 1 mL de acetona, 2 mL de cloroformo y 10 mL de metanol. La solubilidad en agua es de 5 mg en 100 mL. La solubilidad en solución de fosfato Sorensen 0.07 M y solución amortiguadora de fosfatos pH 6, es de 6 mg en 100 mL.

2.1.2. Farmacocinética y Mecanismo de acción.²

Se han llevado a cabo diferentes estudios para evaluar la seguridad de fominoben. Por ejemplo, en ratas, ratones y conejos se evaluó la influencia del fominoben, en la fertilidad, encontrándose que no influye en la fertilidad, tampoco se encontraron efectos teratogénicos ni mutagénicos en estas especies animales, lo que le da a este fármaco carácter de seguridad.¹³ El único efecto secundario encontrado fue en ratas, en las que se observó que presenta propiedades ansiolíticas parecidas a las de las benzodiazepinas.⁹

También se evaluó la toxicidad en ratas y perros, a los cuales se les administró dosis altas de fominoben, sin encontrar daños orgánicos en páncreas, hígado, corazón, pulmón, colon, riñón, intestino, ovarios, útero, hipófisis, cerebro y piel.¹⁶

En relación con los estudios en humanos, se evaluó la farmacocinética del Fominoben, en siete voluntarios de sexo masculino y tres de sexo femenino, a quienes se les administró una dosis de 160 mg de Fominoben por vía oral, así como por vía intravenosa. Los resultados mostraron que el tiempo de vida media se encuentra entre 7 y 9 horas.²²

La absorción del fominoben, es rápida. La concentración máxima en plasma se presenta a las 2 horas después de haber sido administrado por vía oral, para luego descender rápidamente. Si bien el fármaco se distribuye en todos los tejidos, se encuentran niveles elevados en el tracto gastrointestinal, en hígado y en riñones.

Alrededor del 60% de la dosis administrada por vía oral se elimina por la orina después de 72 horas. El fármaco se metaboliza exclusivamente en el hígado. Se forman cuando menos 8 metabolitos, los cuales no tienen actividad farmacológica y no se observa acumulación en órganos ni tejidos.

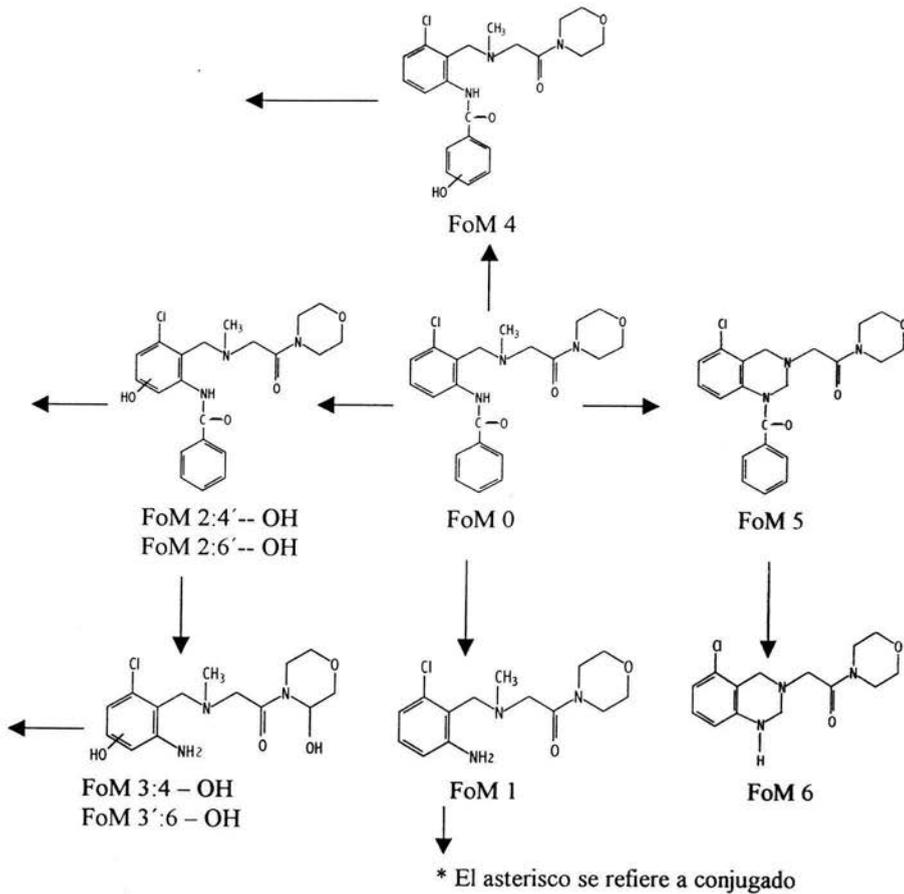


Fig. 2. Metabolitos de fominoben después de su administración oral ²¹.

Mecanismo de acción.

El fominoben inhibe el centro tusígeno, sin ejercer efecto central de tipo depresor, sedante o analgésico. El efecto antitusivo que se logra con 40 a 80 mg de fominoben, corresponde al obtenido con 15 a 30 mg de codeína.

La inhibición selectiva del centro tusígeno con actividad equivalente a la de la codeína, con acción respiratoria analéptica, pero sin efecto depresor, se debe a que su mecanismo de acción es diferente al de cualquier otro antitusivo, ya que está relacionado con la potenciación de los sistemas inhibitorios del centro tusígeno.

En cuanto al efecto analéptico respiratorio, se ha observado que con la administración de fominoben, se incrementa la presión parcial arterial de oxígeno (PaO_2), lo cual se considera que puede ser causado por un aumento en la ventilación alveolar, a través de la estimulación directa del centro respiratorio, o por un aumento en la relación ventilación-perfusión, debido a una mejoría en el intercambio gaseoso derivado del decremento de la diferencia alveolo arterial de oxígeno ($A-aDO_2$).

Este fármaco no presenta interacciones medicamentosas, por lo que no existe riesgo en su administración, aun cuando se esté tomando otro medicamento.

2.1.3. Aplicaciones Terapéuticas.¹⁴

Su uso principal es como antitusivo. Está indicado en el tratamiento de la tos seca, irritante, principalmente durante las noches, en la tos de fumador y en estados postoperatorios donde otros antitusivos que deprimen el centro respiratorio, están contraindicados (resección pulmonar, infiltración inflamatoria, silicosis, sarcoidosis, tumor, tuberculosis o absceso pulmonar).

Se usa también como auxiliar en el tratamiento de enfermedades que provocan obstrucción crónica del tracto respiratorio, con respiración parcial o insuficiencia global y concomitante con falla del ventrículo derecho del corazón.

2.1.4. Precauciones.²

El Fominoben ha demostrado ser un medicamento que en su empleo no da lugar a riesgo de habituación o adicción por lo que es de gran utilidad en el tratamiento de todo tipo de tos.

En 2.9 % de los casos se han reportado efectos secundarios como náusea, vómito, diarrea, molestias gastrointestinales, temblor, mareos o cefaleas, sin relación con las dosis empleadas y que ceden con la supresión del medicamento. A dosis mayores de las indicadas en la terapéutica, pueden presentarse convulsiones.

2.2. Monografía de Metilparabeno.¹

Nombre Químico: 4-hidroxibenzoato de metilo,

- ★ p-hidroxibenzoato de metilo,
- ★ Nipagin M,
- ★ Tegosept M,
- ★ Metil quemosept,
- ★ Metil parasept.

Fórmula Condensada: $C_8H_8O_3$

Estructura:

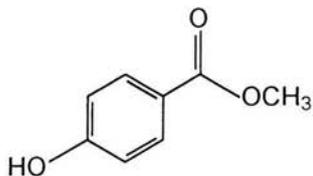


Figura 3. Estructura química del Metilparabeno

Masa Molecular: 152.15 g/mol

Punto de fusión: 131 °C

2.2.1. Propiedades Fisicoquímicas.³

Descripción¹⁴: Cristales pequeños incoloros o polvo cristalino blanco.

Solubilidad¹⁴: Fácilmente soluble en alcohol, éter dietílico y propilenglicol; soluble en agua a ebullición, ligeramente soluble en agua, en benceno y en tetracloruro de carbono.

pka¹¹: 8.4 a 22 °C

Kp¹¹: En miristato de isopropilo: 18.0, en lanolina: 7.0 y en aceite mineral: 0.1.

Uso: Se usa como conservador en comidas, bebidas, cosméticos y medicamentos. Tiene actividad antifúngica y antibacteriana.

2.3. Monografía de Propilparabeno¹.

Nombre Químico: 4-hidroxibenzoato de propilo,

- ★ p-hidroxibenzoato de propilo,
- ★ Nipasol M,
- ★ Solbrol P,
- ★ Propil parasept.

Fórmula Condensada: C₁₀H₁₂O₃

Estructura:

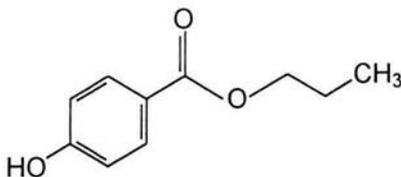


Figura 4. Estructura química del Propilparabeno

Masa Molecular: 180.20 g/mol

Punto de fusión: 96° - 97° C

2.3.1. Propiedades Fisicoquímicas.³

Descripción¹⁴: Cristales incoloros o polvo blanco cristalino.

Solubilidad: Muy soluble en metanol, alcohol, alcohol anhidro, acetona y éter dietílico; ligeramente soluble en agua a ebullición, ligeramente soluble en agua.

pka¹¹: 8.4 a 22 °C

Kp¹¹: En aceite mineral: 0.5, en aceite de maíz: 58.

Uso: Se usa como conservador en comidas, bebidas, cosméticos y medicamentos, con actividad antifúngica y antibacteriana.

2.4. Validación de métodos analíticos

Se define como validación a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. La "validación de un método analítico es un proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas"⁴.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis para el control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta si el método, al evaluarse sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.⁵

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra, a medir en un análisis, por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

Los parámetros importantes en la validación de un método analítico son los siguientes:

2.4.1. Linealidad.

Es la capacidad del método para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés, dentro de un intervalo de concentración establecida.

2.4.2. Intervalo.

Está definido por las concentraciones superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles) en las cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal. El intervalo se expresa en las mismas unidades que los resultados de la prueba.

2.4.3. Exactitud.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente, aplicando el método para determinar un analito en la muestra, y el valor verdadero de referencia de la concentración del analito, en esa muestra. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de la sustancia por analizar.

2.4.4. Precisión.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

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

2.4.5. Reproducibilidad.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes, realizadas por diferentes laboratorios o por diferentes analistas.

2.4.6. Repetibilidad.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas por un solo analista, bajo las mismas condiciones de operación (tiempo, aparato, laboratorio, etc).

2.4.7. Precisión intermedia.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes de operación (analista, tiempo, equipos, etc), en un mismo laboratorio.

2.4.8. Especificidad (Selectividad).

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Los excipientes, las sustancias relacionadas de síntesis y degradación, los disolventes residuales, las impurezas, etc., no deben interferir ni influenciar el resultado analítico.

2.4.9. Limite de detección.

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

2.4.10. Limite de cuantificación.

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

2.4.11. Tolerancia.

Es la medida de la capacidad del método de permanecer inalterable ante pequeñas variaciones en los parámetros, lo que da una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

2.4.12. Robustez.

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferentes temperaturas, diferentes lotes de reactivos, distintas columnas, diferentes sistemas de elusión o tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc), variaciones en las condiciones ambientales, etc. Es normalmente expresado como la falta de influencia de variables ambientales sobre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico. Es una medida de la reproducibilidad de un laboratorio a otro o de un analista a otro.

2.4.13. Estabilidad de la muestra.

Es la propiedad de la muestra preparada para su cuantificación, de conservar su identidad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado, bajo condiciones específicas.

2.4.14. Adecuabilidad del sistema.

Verificación de que un sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros), opera con base en criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el presente trabajo se realizó una serie de actividades, las cuales se muestran en la figura siguiente:

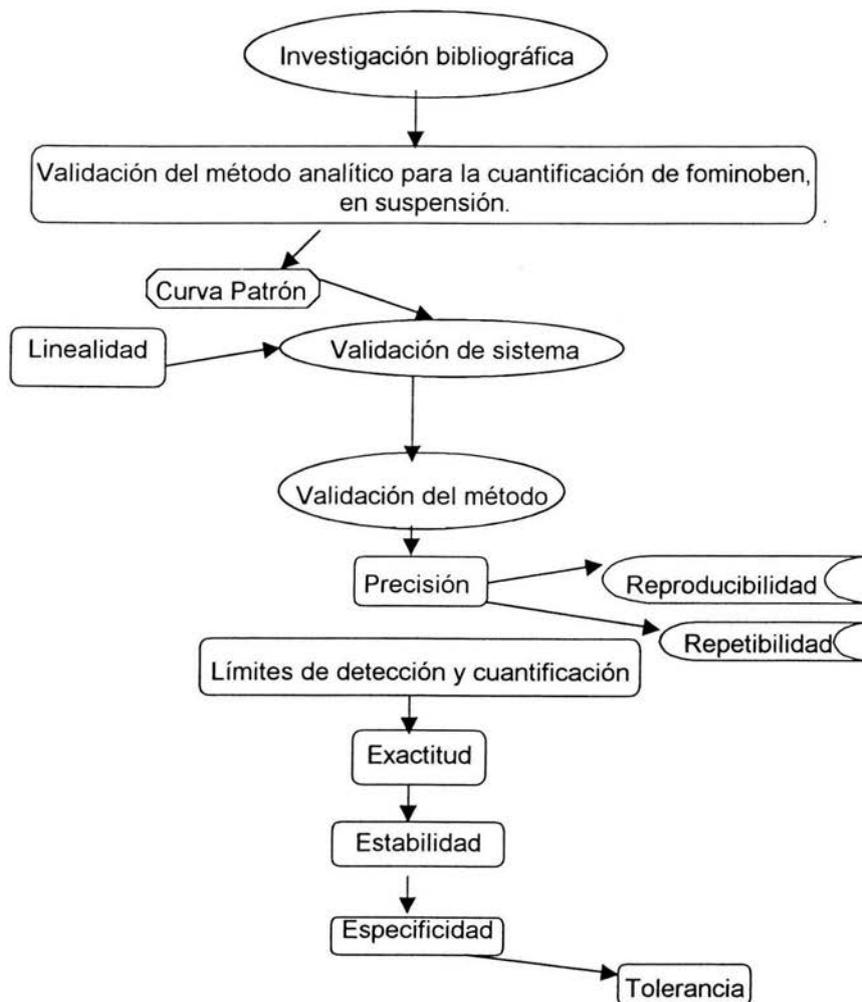


Fig. 5

3.1. Método Analítico por Cromatografía de Líquidos (CLAR) para cuantificar Fominoben, Metilparabeno y Propilparabeno en una suspensión oral.

3.1.1. Reactivos, Equipo y Materiales.

Reactivos.

* Acetonitrilo HPLC EMD, Merck	Lote AX0142-1
* Metanol HPLC EMD, Merck	Lote MX075-1
* Fosfato de Monobásico de Potasio (KH_2PO_4), Merck	Lote A433273 318
* Fosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Merck	Lote K30749780 230
* Agua HPLC, obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Milli Q Waters System.	
* Suspensión oral de Fominoben	Lote 353876 y 355022
Contiene: 1.6 g de fominoben, 0.080 g metilparabeno, 0.020 g propilparabeno en 100 mL.	
* Placebo	Lote LP0312-06 y LP0401-1

Estándares secundarios de: (Pureza 100.0 %)

Fominoben	Lote 0002A/99004
Metilparabeno	Lote 0005/191689
Propilparabeno	Lote 0004A/190858

Equipo.

Cromatógrafo WATERS

Modelos:

Bomba 510MX5SM3224M	Bomba 510510-144336
Automuestreador 717MX6BM5701M	Detector 486
Longitud de onda variable MX6BM6070M	Horno M01CHM594M

Materiales.

Columna: Lichrospher 100, RP 18 de 125 x 3 mm, 5 μm (Merck).

Columna: Lichrosorb RP 18, 5 μm , 125 x 4 mm (Merck).

Precolumna: Purospher RP 18, 1 cm (Merck).

3.1.2. Preparación de Soluciones.

3.1.2.1. Preparación de la fase móvil

Solución de KH_2PO_4 :

Pesar aproximadamente 9.078 g de KH_2PO_4 , colocar en un matraz de 1000 mL, disolver, llevar a volumen con agua y mezclar.

Solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

Pesar aproximadamente 11.876 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, colocarlos en un matraz de 1000 mL, disolver, llevar a volumen con agua y mezclar.

Solución Buffer de Fosfato Sorensen pH 6.8:

Mezclar 1000 mL de la solución de KH_2PO_4 con 1000 mL de la solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Fase móvil:

Mezclar 600 mL de solución buffer de fosfatos Sorensen pH 6.8, con 400 mL de acetonitrilo. Desgasificar por filtración con ayuda de vacío.

3.1.2.2. Preparación de soluciones de referencia.

Preparación de la solución de referencia de conservadores.

Pesar con exactitud aproximadamente 20.0 mg de 4-hidroxibenzoato de propilo y 80.0 mg de 4-hidroxibenzoato de metilo sustancias de referencia y transferir a un matraz volumétrico de 100.0 mL, disolver y llevar a volumen con metanol. Preparar por duplicado.

Las concentraciones finales son: propilparabeno 0.2 mg/mL y metilparabeno 0.8 mg/mL.

Preparación de la solución de referencia de fominoben y conservadores.

Transferir 5.0 mL de la solución de referencia de conservadores, a un matraz volumétrico de 100.0 mL, pesar con exactitud aproximadamente 80.0 mg de fominoben base, sustancia de referencia, transferir al mismo matraz, disolver y llevar a volumen con metanol. Filtrar en papel Whatman 1, desechando los primeros mililitros e inmediatamente llenar el vial de donde se tomará la muestra para inyección. Preparar por duplicado.

La concentración final de propilparabeno es 0.01 mg/mL, la de metilparabeno es 0.04 mg/mL y la de fominoben es 0.80 mg/mL.

Estas concentraciones equivalen al 50 % de lo que contiene la suspensión oral, pero la proporción es la misma.

3.1.2.3. Preparación de la curva patrón

Para la preparación de la curva patrón se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

Se preparó una solución stock pesando 400 mg de fominoben, 5 mg de propilparabeno y 20 mg de metilparabeno los cuales se colocaron en un matraz de 25 mL y se llevó a volumen con metanol. Esta solución contiene 16 mg/mL de fominoben, 0.2 mg/mL de propilparabeno y 0.8 mg/mL de metilparabeno. De esta

solución se tomaron alícuotas para preparar las concentraciones requeridas en la curva patrón.

Se tomó una alícuota de 2 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol, para obtener la solución conteniendo 0.32 mg/mL de fominoben, 0.004 mg/mL de propilparabeno y 0.016 mg/mL de metilparabeno. Esta concentración equivale al 40 %.

Se tomó una alícuota de 4 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol, con ello se obtiene una concentración de 0.64 mg/mL de fominoben, 0.008 mg/mL de propilparabeno y 0.032 mg/mL de metilparabeno. Esta concentración equivale a 80 %.

Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevándose a volumen con metanol, para obtener una concentración de 0.8 mg/mL de fominoben, 0.01 mg/mL de propilparabeno y 0.04 mg/mL de metilparabeno. Esta concentración equivale a 100 %.

Se tomó una alícuota de 6 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevándose a volumen con metanol, para obtener así una concentración de 0.96 mg/mL de fominoben, 0.012 mg/mL de propilparabeno y 0.048 mg/mL de metilparabeno. Esta concentración equivale a 120 %.

Se tomó una alícuota de 4 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 50 mL, llevándose a volumen con metanol, obteniendo así una concentración de 1.28 mg/mL de fominoben, 0.016 mg/mL de propilparabeno y 0.064 mg/mL de metilparabeno. Esta concentración equivale a 160 %.

3.1.3. Método analítico para cuantificar fominoben en la suspensión oral.

Agitar mecánicamente con barra magnética el frasco conteniendo la suspensión oral durante 30 minutos. Abrir el frasco y retirar la barra magnética, cerrar y agitar manualmente durante 1 minuto. Inmediatamente pesar con exactitud alrededor de 6.1 g de la suspensión oral (equivalente a 5.5 mL), tomar la muestra de la parte media del frasco y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 60 mL de metanol, agitar en vortex 5 minutos y llevar a volumen con el mismo disolvente.

Filtrar en papel Whatman 1 desechando los primeros mililitros e inmediatamente llenar el vial para su inyección al cromatógrafo. Preparar por duplicado.

Análisis de la muestra del placebo.

El placebo fue preparado por el departamento de Tecnología de la Producción en la planta de líquidos del Laboratorio fabricante del producto. Este placebo contenía todos los componentes de la suspensión excepto el fominoben. El método utilizado para la cuantificación del placebo fue el mismo que el empleado para la suspensión oral.

Condiciones Cromatográficas.

Las condiciones utilizadas fueron:

Columna: Lichrospher 100, RP 18 de 125 x 3 mm, 5 μ m (Merck).

Precolumna: Purospher RP 18, 1 cm (Merck).

Fase Móvil: 600 mL de Solución Buffer de fosfato Sorensen pH 6.8
400 mL de Acetonitrilo HPLC

Temperatura: Temperatura ambiente

Volumen de inyección: 20 μ L

Flujo: 1.5 mL/min

Longitud de onda: 255 nm

Tiempo de corrida: 10 minutos

3.2. Validación de un método analítico por CLAR para cuantificar Fominoben, Metilparabeno y Propilparabeno en una suspensión oral.

El método analítico se validó tomando en consideración los requerimientos corporativos, así como los parámetros establecidos por las organizaciones regulatorias internacionales.

Los parámetros a evaluar fueron los siguientes:

Especificidad, linealidad, exactitud, precisión del método, precisión intermedia, límite de detección, límite de cuantificación, tolerancia, estabilidad de soluciones de referencia y soluciones de la muestra, estabilidad de fase móvil. Estos requisitos son los que están indicados en el procedimiento normalizado de operación de la empresa para llevar a cabo la validación de un método analítico.

A continuación se describen las pruebas realizadas:

3.2.1. Adecuabilidad del sistema

Basándose en el método analítico, se inyecta 5 veces la solución de referencia al 100 %, conteniendo 0.01 mg/mL de propilparabeno, 0.04 mg/mL de metiparabeno y 0.80 mg/mL de fominoben, posteriormente se inyectó el duplicado de la solución de referencia, conteniendo la misma concentración. El coeficiente de variación de las 6 inyecciones no debe exceder del 2 % y debe cumplir con los siguientes parámetros de adecuación:

Factor de coleo:	No más de 2.5	
Retención relativa (k´):	Metilparabeno	aproximadamente 1.7
	Propilparabeno	aproximadamente 3.5
	Fominoben	aproximadamente 8.3

3.2.2. Especificidad

Empleando el método descrito, se analizaron soluciones de:

1. Sustancias de referencia de fominoben, metilparabeno y propilparabeno al 100%
2. Muestras de placebo
3. Muestras de la suspensión oral

Cada solución se preparó por duplicado y cada una de ellas se inyectó 2 veces.

Las soluciones se sometieron a diferentes condiciones de estrés, que se describen a continuación:

- 1. Baño María por una hora.** Una vez preparadas las soluciones el matraz se colocó en baño María durante una hora y posteriormente se analizó por CLAR.
- 2. Luz U.V. por una hora.** Las soluciones se colocaron bajo luz U. V. por una hora y después se analizaron por CLAR.
- 3. HCl 1 N.** Antes de llevar a volumen, se adicionaron 2 mL de HCl 1 N para su análisis posterior.
- 4. NaOH 1 N.** Antes de llevar a volumen, se adicionaron 2 mL NaOH y se siguió el mismo método análisis.
- 5. H₂O₂.** Antes de llevar a volumen las soluciones, se adicionaron 2 mL de peróxido de hidrógeno y se analizaron empleando el método descrito.

3.2.3. Linealidad del sistema

Se evaluó la linealidad de la respuesta preparando dos curvas de la solución de referencia, a cinco niveles diferentes de concentración, en un intervalo de 40 a 160% de la concentración teórica que contiene la suspensión oral. Para ello se prepararon dos curvas y cada nivel se inyectó por triplicado. Se calculó la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.

Como bien se ha señalado en la preparación de la curva patrón (página 17), ésta corresponde a la linealidad del sistema.

3.2.4. Exactitud del método

Se prepararon por triplicado muestras de placebos cargados con tres concentraciones diferentes de fominoben, metilparabeno y propilparabeno, en el intervalo de 80 al 120 % de la concentración teórica, y cada preparación se inyectó por triplicado. Se calculó el promedio y la desviación estándar, así como el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro.

Se utilizó este intervalo de concentraciones porque el procedimiento interno de la empresa indica seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior a la cantidad de principio activo correspondiente al 100% de concentración. El placebo utilizado no contenía fominoben, metilparabeno ni propilparabeno, por lo que se le adicionó la cantidad correspondiente al 100% de concentración.

Se preparó una solución Stock de conservadores pesando 80 mg de metilparabeno y 20 mg de propilparabeno, los cuales se colocaron en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol. En esta solución se tuvo una concentración final de 0.8 mg/mL de metilparabeno y 0.2 mg/mL de propilparabeno.

Se tomó una alícuota de 4 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, se adicionaron 64 mg de fominoben y 6.1 g de placebo, se agregaron 60 mL de metanol y se agitó en vortex por 5 minutos y posteriormente se llevó a volumen con metanol. Teniendo como concentración final 0.64 mg/mL de fominoben, 0.032 mg/mL de metilparabeno y 0.008 mg/mL de propilparabeno, lo que equivale al 80 %.

Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, se adicionaron 80 mg de fominoben y 6.1 g de placebo, se agregaron 60 mL de metanol y se agitó en vortex por 5 minutos y posteriormente se llevó a volumen con metanol. Teniendo como concentración final 0.80 mg/mL de fominoben, 0.04 mg/mL de metilparabeno y 0.01 mg/mL de propilparabeno, lo que equivale al 100 %.

Se tomó una alícuota de 6 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, se adicionaron 96 mg de fominoben y 6.1 g de placebo, se agregaron 60 mL de metanol y se agitó en vortex por 5 minutos y posteriormente se llevó a volumen con metanol. Teniendo como concentración final 0.96 mg/mL de fominoben, 0.048 mg/mL de metilparabeno y 0.012 mg/mL de propilparabeno, lo que equivale al 120 %.

3.2.5. Precisión del método (Repetibilidad)

La precisión del método se evaluó analizando 6 diferentes preparaciones de una misma muestra de la suspensión oral a una concentración del 100%, por un analista, en dos días, analizando tres preparaciones por día y realizando tres inyecciones por cada una.

Se calcularon el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos.

3.2.6. Precisión intermedia (Reproducibilidad)

La precisión intermedia se evaluó analizando 6 diferentes preparaciones de una misma muestra de la suspensión oral, por dos analistas, en dos días, analizando tres preparaciones por día, y realizando tres inyecciones por cada una.

Se calcularon el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos.

3.2.7. Límite de detección y cuantificación

Para la determinación del límite de detección y del límite de cuantificación, se prepararon dos curvas de calibración, en el intervalo de concentraciones del 5 a 30%. Se calcularon la pendiente, la desviación estándar de la regresión y el coeficiente de determinación. Se emplearon distintas formulas¹ para calcular el límite de detección y el de cuantificación.

Se preparó una solución Stock pesando 400 mg de fominoben, 5 mg de propilparabeno, 20 mg de metilparabeno y se colocaron en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol. La solución contiene 4 mg/mL de fominoben, 0.05 mg/mL de propilparabeno y 0.2 mg/mL de metilparabeno.

¹ Estas formulas corresponden a las mismas que se indican y se desarrollan en los resultados.

Se tomó una alícuota de 1 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol, de esta forma se obtuvo una concentración de 0.04 mg/mL de fominoben, 0.0005 mg/mL de propilparabeno y 0.002 mg/mL de metilparabeno, lo que equivale al 5 %.

Se tomó una alícuota de 2 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol, para obtener una concentración de 0.08 mg/mL de fominoben, 0.001 mg/mL de propilparabeno y 0.004 mg/mL de metilparabeno, lo que equivale al 10 %.

Se tomó una alícuota de 4 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol, para obtener una concentración de 0.16 mg/mL de fominoben, 0.002 mg/mL de propilparabeno y 0.008 mg/mL de metilparabeno, lo que equivale al 20 %.

Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol, para obtener una concentración de 0.200 mg/mL de fominoben, 0.0025 mg/mL de propilparabeno y 0.010 mg/mL de metilparabeno, lo que equivale al 25 %.

Se tomó una alícuota de 6 mL de la solución Stock y se colocó en un matraz de 100 mL, llevando a volumen con metanol, para obtener una concentración de 0.24 mg/mL de fominoben, 0.003 mg/mL de propilparabeno y 0.012 mg/mL de metilparabeno, lo que equivale al 30 %.

3.2.8. Tolerancia.

La prueba de tolerancia se llevó a cabo realizando cambios en la polaridad de la fase móvil, utilizando otra columna similar, cambiando los filtros y evaluando la estabilidad de las soluciones de referencia al 100% y muestras de producto terminado. De los resultados obtenidos de los estudios efectuados con cada una

de las condiciones, se calculó el coeficiente de variación y se hizo una comparación entre éstos.

A continuación se describen los procedimientos utilizados:

3.2.8.1. Cambios en la proporción de la fase móvil.

Se realizaron cambios en la proporción de la fase móvil para observar como afectaban éstos a los parámetros cromatograficos, tanto al analizar muestras de producto terminado, como las soluciones estándar al 100%.

Se analizaron utilizando fase móvil en su proporción normal (60:40, buffer sorensen:acetonitrilo), con un aumento del 10% en la proporción orgánica (50:50, buffer sorensen:acetonitrilo) y con un aumento del 10% en la proporción acuosa (70:30, buffer sorensen:acetonitrilo).

3.2.8.2. Cambio de columna.

Para evaluar la tolerancia del método se empleó una columna Lichrosorb RP-18, 5µm, 125 x 4 mm Merck, similar a la empleada durante la validación del método (Lichrospher 100, RP-18 de 125 x 3 mm, 5µm Merck). En cada una de ellas se analizaron dos soluciones de referencia al 100% y tres muestras de producto terminado y se compararon los porcentajes de recobro, así como los resultados de los parámetros evaluados como son: los platos teóricos, el factor de coleo, el factor de capacidad, el tiempo de retención y el coeficiente de variación obtenido.

3.2.8.3. Cambio de filtros.

Considerando que antes de inyectar las muestras al cromatógrafo éstas se deben filtrar, se evaluó la influencia del filtro. Para ello se prepararon muestras a una concentración del 100% , se filtraron a través de filtros Whatman de 0.2 µm, y filtros de nylon de 0.45 µm. Se analizaron los porcentajes de recobro, así como los parámetros cromatográficos.

3.2.9. Estabilidad de muestras de producto terminado y soluciones de referencia.

La estabilidad se evaluó preparando tres muestras de producto terminado y dos de la solución de referencia al 100%, las cuales fueron analizadas después de 12, 24, 48 y 72 horas.

Las muestras de producto terminado y las soluciones de referencia se almacenaron a temperatura ambiente y en refrigeración durante el tiempo indicado y se analizaron. Los resultados se compararon con el obtenido con la solución estándar al 100 % preparada el día del análisis. Se calcularon los porcentajes de recobro obtenidos en los diferentes tiempos y se hizo una comparación entre éstos. El criterio de aceptación es que no debe de existir una diferencia mayor al 2%.

3.2.10. Estabilidad de la fase móvil.

Se prepararon soluciones de referencia al 100 %, las cuales se analizaron empleando la fase móvil preparada el mismo día de análisis. Una parte de la fase móvil se almacenó en refrigeración y la restante se almacenó a temperatura ambiente. A las 48 horas se prepararon nuevamente soluciones de referencia al 100% y se corrieron en la fase móvil almacenada, tanto a temperatura ambiente, como en refrigeración. Este procedimiento se repitió a los 7 días.

Se compararon los resultados obtenidos en los diferentes días y se determinó el tiempo durante el cual puede almacenarse la fase móvil.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión.

4.1. Especificidad del método analítico

En las figuras 13 a 28 del apéndice B se presentan los cromatogramas obtenidos. En ellos se puede observar que el método analítico propuesto es específico, al no observarse ninguna señal debida a excipientes o a productos de degradación de los principios activos o excipientes.

4.2. Linealidad del sistema para la cuantificación de Fominoben, metilparabeno y propilparabeno.

En la tabla 1 se presentan los resultados de la prueba de linealidad del sistema del fominoben en el intervalo de concentración de 40 a 160 % y en la figura 6 se muestra la gráfica correspondiente.

TABLA 1

Valores individuales de concentración-respuesta, resultantes de la cuantificación de fominoben en solución de referencia.

NIVEL	INYECCION	Curva	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA (AREA)	FACTOR (AREA/Con.)	
40	1	1	320	5558077.0	17368.99	
	2		320	5865206.0	18328.77	
	3		320	5883909.0	18387.22	
	40	1	2	320	5859273.0	18310.23
		2		320	5996243.5	18738.26
		3		320	5936175.0	18550.55
	80	1	1	640	11598111.0	18122.05
		2		640	11580174.0	18094.02
		3		640	11646386.5	18197.48
80		1	2	640	11487350.0	17948.98
		2		640	12178482.5	19028.88
		3		640	12137004.5	18964.07
100	1	1	800	14934685.0	18668.36	
	2		800	15092750.5	18865.94	
	3		800	14967381.0	18709.23	
	100	1	2	800	15245490.5	19056.86
		2		800	15197218.0	18996.52
		3		800	15228424.0	19035.53
120	1	1	960	18213734.5	18972.64	
	2		960	18234238.0	18994.00	
	3		960	18315186.0	19078.32	
	120	1	2	960	18718830.0	19498.78
		2		960	17624935.0	18359.31
		3		960	17500177.0	18229.35
160	1	1	1280	23888525.0	18662.91	
	2		1280	23949862.5	18710.83	
	3		1280	23955423.0	18715.17	
	160	1	2	1280	23484152.0	18346.99
		2		1280	23673044.5	18494.57
		3		1280	23476775.0	18341.23

Promedio= 18592.53
 Desv. Est.= 434.12
 C.V.= 2.3 %

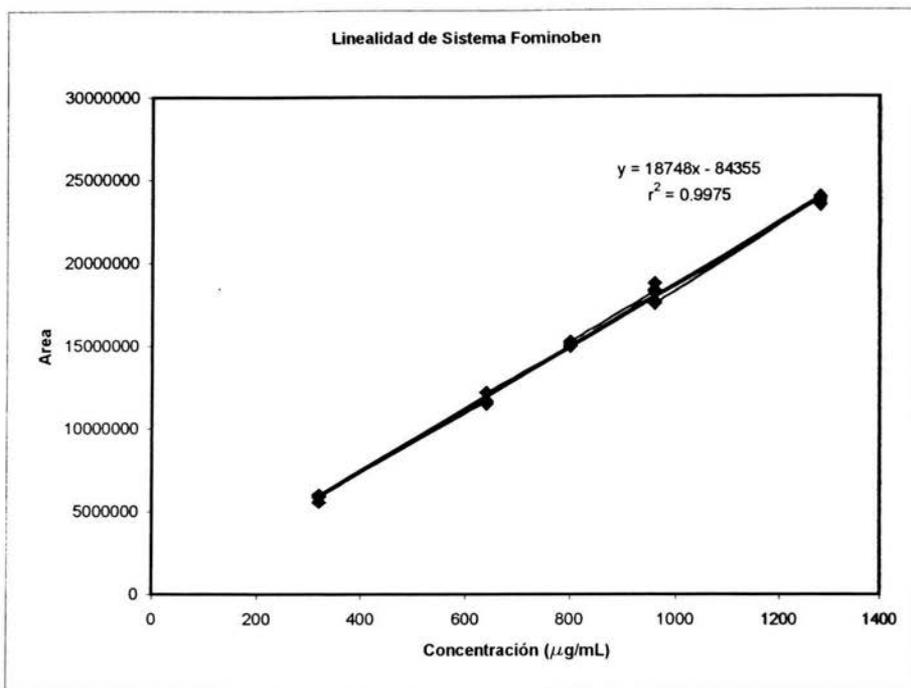


Figura 6: Linealidad del sistema para la cuantificación de Fominoben.

Al hacer el análisis estadístico, se encontró que el modelo que describe dicha relación se ajusta a una línea recta, cuya fórmula es la siguiente:

Pendiente (m) =	18748.24414
Ordenada al origen (b) =	-84354.52917
Coefficiente de correlación =	0.9987
Coefficiente de determinación (r ²) =	0.9975

Dado que el criterio de aceptación es que el coeficiente de determinación no debe ser menor de 0.98, se demuestra la linealidad del sistema para el fominoben.

En la tabla 2 se presentan los resultados de linealidad del sistema en el intervalo de concentración de 40 a 160 % para el metilparabeno y en la figura 7 se muestra la gráfica correspondiente.

TABLA 2

Valores individuales de concentración-respuesta, resultantes de la cuantificación de metilparabeno en solución estándar.

NIVEL %	INYECCION	Curva	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA (AREA)	FACTOR (AREA/Con.)
40	1	1	16	1084216.0	67763.50
	2		16	1150489.0	71905.56
	3		16	1140472.0	71279.50
	1	2	16	1130762.0	70672.63
	2		16	1166198.0	72887.38
	3		16	1168373.0	73023.31
80	1	1	32	2244775.5	70149.23
	2		32	2262729.0	70710.28
	3		32	2247010.0	70219.06
	1	2	32	2199323.0	68728.84
	2		32	2323182.5	72599.45
	3		32	2339078.0	73096.19
100	1	1	40	2858316.5	71457.91
	2		40	2891183.5	72279.59
	3		40	2853862.0	71346.55
	1	2	40	2898380.5	72459.51
	2		40	2902065.0	72551.63
	3		40	2912406.0	72810.15
120	1	1	48	3446644.0	71805.08
	2		48	3458618.0	72054.54
	3		48	3467327.0	72235.98
	1	2	48	3538629.5	73721.45
	2		48	3360150.0	70003.13
	3		48	3310623.5	68971.32
160	1	1	64	4491199.0	70174.98
	2		64	4505607.0	70400.11
	3		64	4513458.0	70522.78
	1	2	64	4400515.0	68758.05
	2		64	4553315.0	71145.55
	3		64	4409266.0	68894.78

Promedio= 71154.27
 Desv. Est.= 1534.47
 C.V.= 2.2 %

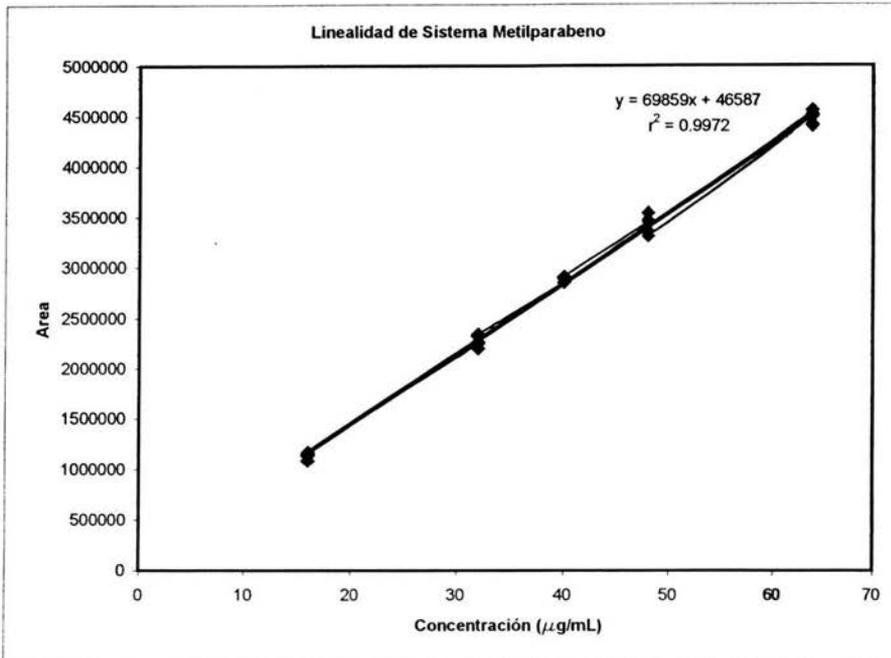


Figura 7: Linealidad del sistema para la cuantificación de Metilparabeno

Al hacer el análisis estadístico, se encontró que el modelo que describe dicha relación se ajusta a una línea recta, cuya fórmula es la siguiente:

Pendiente (m) =	69858.79583
Ordenada al origen (b) =	46587.28333
Coefficiente de correlación =	0.9986
Coefficiente de determinación (r ²) =	0.9972

Dado que el criterio de aceptación es que el coeficiente de determinación no debe ser menor de 0.98, se demuestra la linealidad del sistema para el metilparabeno.

En la tabla 3 se presentan los resultados de linealidad del sistema en el intervalo de concentración de 40 a 160 % para el propilparabeno y en la figura 8 se muestra la gráfica correspondiente.

TABLA 3

Valores individuales de concentración-respuesta, resultantes de la cuantificación de propilparabeno en solución estándar.

NIVEL %	INYECCION	Curva	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA (AREA)	FACTOR (AREA/Con.)
40	1	1	4	240679.0	60169.75
	2		4	254015.0	63503.75
	3		4	263307.0	65826.75
	1	2	4	251043.5	62760.88
	2		4	257138.0	64284.50
	3		4	258315.0	64578.75
80	1	1	8	512392.0	64049.00
	2		8	508632.0	63579.00
	3		8	510752.0	63844.00
	1	2	8	496033.0	62004.13
	2		8	526809.5	65851.19
	3		8	520996.0	65124.50
100	1	1	10	656598.0	65659.80
	2		10	655338.0	65533.80
	3		10	664071.0	66407.10
	1	2	10	657965.0	65796.50
	2		10	659617.0	65961.70
	3		10	662205.0	66220.50
120	1	1	12	797414.0	66451.17
	2		12	803066.0	66922.17
	3		12	800289.0	66690.75
	1	2	12	809965.0	67497.08
	2		12	769205.0	64100.42
	3		12	756135.0	63011.25
160	1	1	16	1056868.0	66054.25
	2		16	1061394.0	66337.13
	3		16	1063683.0	66480.19
	1	2	16	1033137.0	64571.06
	2		16	1036411.0	64775.69
	3		16	1049577.5	65598.59

Promedio= 64988.18
 Desv. Est.= 1629.67
 C.V.= 2.5 %

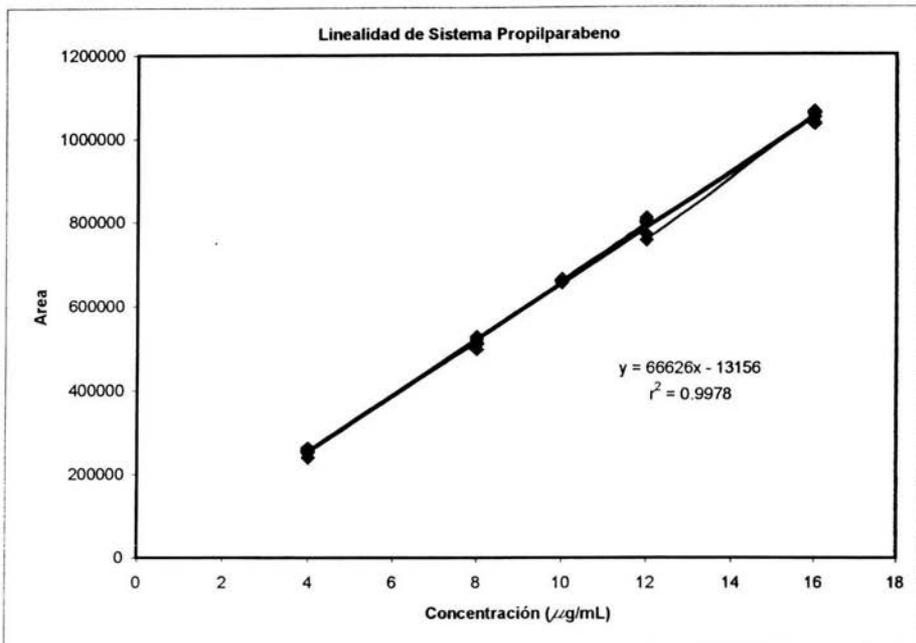


Figura 8: Linealidad del sistema para la cuantificación de Propilparabeno

Al hacer el análisis estadístico, se encontró que el modelo que describe dicha relación se ajusta a una línea recta, cuya fórmula es la siguiente:

Pendiente (m) = 66625.74375
 Ordenada al origen (b) = -13155.75417
 Coeficiente de correlación = 0.9989
 Coeficiente de determinación (r^2) = 0.9978

Dado que el criterio de aceptación es que el coeficiente de determinación no debe ser menor de 0.98, se demuestra la linealidad del sistema para el propilparabeno.

4.3. Exactitud del método para la cuantificación de fominoben, metilparabeno y propilparabeno en una suspensión oral.

En las tablas 4, 5 y 6 se muestran los datos de los porcentajes de recobro para fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión en un intervalo de concentraciones de 80 a 120 %.

TABLA 4
Exactitud del método analítico para la cuantificación de fominoben en suspensión.

NIVEL (%)	No. de inyección	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% de recobro
80	1	0.640	0.643	100.4
	2	0.640	0.645	100.9
	3	0.640	0.653	102.0
	1	0.640	0.631	98.5
	2	0.640	0.647	101.0
	3	0.640	0.631	98.6
	1	0.640	0.633	98.9
	2	0.640	0.645	100.9
	3	0.640	0.648	101.3
100	1	0.800	0.814	101.7
	2	0.800	0.812	101.5
	3	0.800	0.809	101.1
	1	0.800	0.799	99.9
	2	0.800	0.800	100.0
	3	0.800	0.802	100.3
	1	0.800	0.787	98.3
	2	0.800	0.804	100.6
	3	0.800	0.806	100.8
120	1	0.960	0.950	99.0
	2	0.960	0.965	100.5
	3	0.960	0.971	101.1
	1	0.960	0.963	100.4
	2	0.960	0.974	101.5
	3	0.960	0.979	102.0
	1	0.960	0.957	99.7
	2	0.960	0.963	100.3
	3	0.960	0.971	101.2

PROMEDIO = 100.5 %
Desv. Est. = 0.5
C.V. = 0.5 %

TABLA 5
Exactitud del método para la cuantificación de metilparabeno en suspensión.

Nivel (%)	No. de Inyección	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% de recobro
80	1	0.032	0.032	100.8
	2	0.032	0.032	101.2
	3	0.032	0.033	102.4
	1	0.032	0.032	99.1
	2	0.032	0.032	101.6
	3	0.032	0.032	99.3
	1	0.032	0.032	99.9
	2	0.032	0.032	101.6
	3	0.032	0.033	102.1
100	1	0.040	0.041	102.2
	2	0.040	0.041	102.0
	3	0.040	0.041	101.7
	1	0.040	0.040	100.4
	2	0.040	0.040	100.6
	3	0.040	0.040	100.7
	1	0.040	0.039	97.1
	2	0.040	0.040	100.8
	3	0.040	0.040	100.8
120	1	0.048	0.047	98.1
	2	0.048	0.048	99.4
	3	0.048	0.048	100.3
	1	0.048	0.048	99.9
	2	0.048	0.048	100.3
	3	0.048	0.049	101.3
	1	0.048	0.047	98.7
	2	0.048	0.048	100.0
	3	0.048	0.048	101.0

PROMEDIO = 100.5 %
Desv. Est. = 0.1
C.V. = 0.1 %

TABLA 6
Exactitud del método para la cuantificación de propilparabeno en suspensión.

NIVEL (%)	No. de inyección	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% de recobro
80	1	0.008	0.008	102.0
	2	0.008	0.008	102.4
	3	0.008	0.008	103.7
	1	0.008	0.008	98.6
	2	0.008	0.008	101.1
	3	0.008	0.008	98.7
	1	0.008	0.008	99.1
	2	0.008	0.008	100.6
	3	0.008	0.008	100.9
100	1	0.010	0.010	104.1
	2	0.010	0.010	103.9
	3	0.010	0.010	103.4
	1	0.010	0.010	100.4
	2	0.010	0.010	100.6
	3	0.010	0.010	100.7
	1	0.010	0.010	97.5
	2	0.010	0.010	100.4
	3	0.010	0.010	100.6
120	1	0.012	0.012	100.7
	2	0.012	0.012	102.3
	3	0.012	0.012	102.8
	1	0.012	0.012	101.0
	2	0.012	0.012	101.5
	3	0.012	0.012	102.4
	1	0.012	0.012	99.3
	2	0.012	0.012	100.4
	3	0.012	0.012	101.3

PROMEDIO = 101.1 %
Desv. Est. = 0.5
C.V. = 0.5 %

El criterio de aceptación es que el porcentaje de recobro debe encontrarse entre 95% y 105%. En las tablas se puede observar los valores promedio para fominoben, metilparabeno y propilparabeno fueron 100.5, 100.5 y 101.1. Asimismo, el coeficiente de variación fue menor al 2%, lo cual indica que el método es exacto para la cuantificación del fármaco y de los conservadores.

4.4. Precisión del método (Repetibilidad) para la cuantificación de fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión oral.

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de precisión del método analítico, evaluada como repetibilidad, realizada en dos días por un mismo analista.

TABLA 7
Precisión (Repetibilidad) del método para la cuantificación fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión.

		FOMINO BEN	METILPARABENO	PROPILPARABENO
DIA	MUESTRA	% DE RECOBRO	% DE RECOBRO	% DE RECOBRO
1	1	106.1	100.9	102.4
		106.3	101.7	103.5
		107.0	101.7	103.6
	2	103.9	100.6	101.4
		104.5	102.0	102.6
		104.3	101.6	102.7
	3	100.3	99.0	99.0
		104.2	102.3	102.7
		104.2	103.4	103.3
2	1	105.1	100.8	103.4
		105.1	101.0	103.3
		105.5	101.1	103.5
	2	100.8	97.9	99.9
		103.8	101.1	103.3
		104.6	101.9	104.3
	3	102.6	102.3	103.9
		102.5	102.1	103.7
		102.5	102.1	103.8

% Promedio =	104.1	101.3	102.8
Desv. Est. =	1.8	1.3	1.4
% C.V. =	1.7	1.2	1.4

Se puede observar que el coeficiente de variación es menor al 2 %, lo cual muestra que el método analítico permite cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno con precisión.

TABLA 9

Reproducibilidad (Precisión intermedia) del método analítico para la cuantificación de metilparabeno en suspensión.

METILPARABENO				
DIA	MUESTRA	INYECCION	% RECOBRO	
			ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	1	1	100.9	103.3
		2	101.7	100.8
		3	101.7	102.1
	2	1	100.6	104.6
		2	102.0	101.8
		3	101.6	103.2
	3	1	99.0	103.9
		2	102.3	104.3
		3	103.4	104.7
2	1	1	100.8	101.2
		2	101.0	101.4
		3	101.1	101.4
	2	1	97.9	101.4
		2	101.1	101.6
		3	101.9	101.9
	3	1	102.3	101.1
		2	102.1	101.3
		3	102.1	101.4

PROMEDIO (%)	101.8 %
Desv. Est.	1.4
C.V. (%)	1.3 %

TABLA 10

Reproducibilidad (Precisión intermedia) del método analítico para la cuantificación de propilparabeno en suspensión.

PROPILPARABENO				
DIA	MUESTRA	INYECCION	% RECOBRO	
			ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	1	1	102.4	104.4
		2	103.5	102.0
		3	103.6	103.5
	2	1	101.4	103.4
		2	102.6	103.5
		3	102.7	104.6
	3	1	99.0	105.1
		2	102.7	105.4
		3	103.3	105.6
2	1	1	103.4	103.4
		2	103.3	103.4
		3	103.5	103.4
	2	1	99.9	103.9
		2	103.3	104.0
		3	104.3	104.2
	3	1	103.9	103.7
		2	103.7	103.8
		3	103.8	103.8

PROMEDIO (%)	103.4 %
Desv. Est.	1.3
C.V. (%)	1.2 %

4.6. Determinación del límite de detección y el límite de cuantificación del método analítico para la cuantificación de fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión oral.

En las tablas 11, 12 y 13 se presentan los valores de respuesta obtenidos al cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión oral. A partir de ellos se calculó el límite de detección empleando la fórmula: $(3.3 * S_{y/x})/b_1$ y el límite de cuantificación empleando la fórmula: $(10 * S_{y/x})/b_1$.⁴

TABLA 11
Determinación de los límites de detección y de cuantificación del método para determinar fominoben.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	RESPUESTA
40	715150.3
40	720778.1
80	1425772.3
80	1408701.1
160	2840231.8
160	2830876.4
200	3554644.4
200	3535673.3
240	4190458.2
240	4260861.1

	Pendiente (b_1) =	17594.1	
	$S_{y/x}$	20982.86	
LD=	$\frac{3.3 * S_{y/x}}{b_1}$	3.936	µg/mL
LC=	$\frac{10 * S_{y/x}}{b_1}$	11.926	µg/mL
	$r^2 =$	0.999793	²

b_1 = Pendiente

$S_{y/x}$ = Desviación estándar de regresión

r^2 = coeficiente de determinación

² Estas formulas son utilizadas de acuerdo con el apéndice A.

TABLA 12
Determinación de los límites de detección y de cuantificación del método para determinar metilparabeno.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA
2	142436.5
2	143354.5
4	281399.8
4	277466.3
8	557541.3
8	556277.4
10	698590.5
10	693049.6
12	823222.3
12	836938

Pendiente (b_1) =	68909.4	
$S_{y/x}$	4102.08	
LD =	0.196	$\mu\text{g/mL}$
LC =	0.595	$\mu\text{g/mL}$
r^2 =	0.999794	

TABLA 13
Determinación de los límites de detección y de cuantificación del método para determinar propilparabeno.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA
0.5	30219.4
0.5	30278.7
1.0	60300.4
1.0	59151.6
2.0	120928.6
2.0	120151.4
2.5	151750.3
2.5	150005.1
3.0	179226.1
3.0	182084.3

Pendiente (b_1) =	60326.5	
$S_{y/x}$	950.87	
LD =	0.052	$\mu\text{g/mL}$
LC =	0.158	$\mu\text{g/mL}$
r^2 =	0.999769	

El criterio de aceptación de esta prueba es tener un coeficiente de determinación mayor a 0.98, para poder aplicar la fórmula de forma segura, por lo que los

4.7. Tolerancia del método analítico para la cuantificación de fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión oral.

4.7.1. Influencia del cambio en la proporción de la fase móvil.

En las tablas 14 se presentan los resultados obtenidos de los parámetros cromatográficos al hacer cambios en la proporción de la fase móvil.

Tabla 14
Tolerancia del método a cambios en la proporción de la fase móvil para fominoben, metilparabeno y propilparabeno.

CONCEPTO	RESULTADOS FASE MOVIL NORMAL	FOMINO BEN CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	
			CON 10% MENOS DE ACETONITRILLO	CON 10% MAS DE ACETONITRILLO
Coleo (T):	0.9	Entre 0.5 y 2.0	0.9	1.7
Tiempo de retención (TR):	6.1	No se ve afectado sensiblemente y no se afecta la selectividad	19.7	2.6
K:	5.1	No debe haber una variación mayor del 50%	267.2	-68.6
C.V. (%):	1.8	No mayor del 2.0%	5.7	2.1

CONCEPTO	RESULTADOS FASE MOVIL NORMAL	METILPARABENO CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADO	
			CON 10% MENOS DE ACETONITRILLO	CON 10% MAS DE ACETONITRILLO
Coleo (T):	1.2	Entre 0.5 y 2.0	1.1	1.2
Tiempo de retención (TR):	1.2	No se ve afectado sensiblemente y no se afecta la selectividad	1.7	0.9
K:	0.2	No debe haber una variación mayor del 50%	250.0	-150.0
C.V. (%):	1.8	No mayor del 2.0%	6.0	2.0

CONCEPTO	RESULTADOS FASE MOVIL NORMAL	PROPILPARABENO CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADO	
			CON 10% MENOS DE ACETONITRILLO	CON 10% MAS DE ACETONITRILLO
Coleo (T):	1.0	Entre 0.5 y 2.0	0.9	1.2
Tiempo de retención (TR):	2.5	No se ve afectado sensiblemente y no se afecta la selectividad	5.4	1.4
K:	1.5	No debe haber una variación mayor del 50%	192.5	-73.3
C.V. (%):	1.7	No mayor del 2.0%	5.7	1.9

Se puede observar que la variación fue mayor al 2 % en los tiempos de retención, por lo tanto se considera que el método no es tolerante a estos cambios.

4.7.2. Influencia del cambio de columna en el método para cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en suspensión.

En la tabla 15 se muestran los parámetros cromatográficos obtenidos al emplear las dos columnas diferentes.

TABLA 15
Parámetros cromatográficos obtenidos al cambiar la columna.

COLUMNA A Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m) 125-3
COLUMNA B Lichrosorb RP-18 (5 μ m) 125-4

	COLUMNA	NPT	Factor de coleo	Factor de capacidad	Tiempo de retención	C.V (%) Solución de referencia
Metilparabeno	A	1021.1	1.3	0.1	1.2	0.9
Propilparabeno		2183.8	1.2	1.6	2.6	1.1
Fominoben		3063.6	1.1	5.4	6.4	0.9
Metilparabeno	B	2252.5	1.4	0.7	1.7	0.6
Propilparabeno		3811.5	1.3	2.4	3.4	0.6
Fominoben		4468.5	1.3	7.5	8.5	0.6

	COLUMNA	Encontrado (%)			Estadística	
		MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	Promedio	C.V. (%)
Metilparabeno	A	99.96	100.24	100.49	100.2	0.3
Propilparabeno		98.77	99.22	99.62	99.2	0.4
Fominoben		101.18	102.07	102.51	101.9	0.7
Metilparabeno	B	101.57	102.06	102.02	101.9	0.3
Propilparabeno		100.20	101.00	100.87	100.7	0.4
Fominoben		102.32	102.95	102.79	102.7	0.3

Se observa que no existe una gran diferencia en los parámetros seleccionados y además el porcentaje de recobro no varió significativamente, lo cual indica que se puede emplear cualquiera de las dos columnas para la cuantificación de fominoben.

4.7.3. Influencia del cambio de filtros utilizados en el método para cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno.

En las tablas 16, 17, 18 y 19 se muestran los valores de los parámetros cromatográficos obtenidos al emplear los 2 filtros diferentes. En ellas se observa que no existe diferencia en los resultados, por lo que se comprueba que el método es tolerante a este cambio y por lo tanto se pueden utilizar ambos tipos de filtros.

TABLA 16 TOLERANCIA. CAMBIO DE FILTROS. FOMINO BEN			
PARAMETRO	FILTRO PRUEBA 0.45 μm	CRITERIOS	FILTRO NORMAL 0.2 μm
COLEO (T)	0.975	Entre 0.5 - 2.0	0.9
TIEMPO RETENCION (TR)	6.323	No se ve afectado sensiblemente y no afecta la selectividad	6.323
K'	5.3	No tiene valor mayor del 50 %	5.325
C.V. (%)	0.25	No varía más de 20 %	0.93

TABLA 17 TOLERANCIA. CAMBIO DE FILTRO. METILPARABENO.			
PARAMETRO	FILTRO PRUEBA 0.45 μm	CRITERIOS	FILTRO NORMAL 0.2 μm
COLEO (T)	1.275	Entre 0.5 - 2.0	1.2
TIEMPO RETENCION (TR)	1.158	No se ve afectado sensiblemente y no afecta la selectividad	1.158
K'	0.2	No tiene valor mayor del 50 %	0.2
C.V. (%)	0.22	No varía más de 20 %	1.13

TABLA 18 TOLERANCIA. CAMBIO DE FILTRO. PROPILPARABENO.			
PARAMETRO	FILTRO PRUEBA 0.45 μm	CRITERIOS	FILTRO NORMAL 0.2 μm
COLEO (T)	1	Entre 0.5 - 2.0	1
TIEMPO RETENCION (TR)	2.548	No se ve afectado sensiblemente y no afecta la selectividad	2.545
K'	1.525	No tiene valor mayor del 50 %	1.525
C.V. (%)	0.12	No varía más de 20 %	1.10

TABLA 19

Comparación de los porcentajes de recobro obtenidos con ambos tipos de filtros.			
Tipo de filtro	% Propilparabeno	% Metilparabeno	% Fominoben
Filtro whatman No. 1	100.4	101.1	102.0
Nylon 0.45 micras	100.3	101.1	101.7

Promedio (%)	100.4 %	101.1 %	101.8 %
Desv. Est.	0.12	0.06	0.16
C.V. (%)	0.1 %	0.1 %	0.2 %
Promedio General	101.1 %		
Desv. Est. General	0.669		
C.V. General	0.662 %		

4.8. Estabilidad de las soluciones de referencia y de las soluciones de las muestras de producto terminado.

En las tablas 20 a 31 se muestran los resultados de los porcentajes de recobro obtenidos de las soluciones de referencia y de las soluciones de las muestras, para fominoben, metilparabeno y propilparabeno, a los diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

TABLA 20 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura ambiente.

FOMINO BEN

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	101.178	102.068	102.508	98.82	97.91
24 HORAS	103.691	102.778	104.822	98.95	104.64
DIFERENCIA %	-2.513	-0.71	-2.314	-0.13	-6.73
48 HORAS	105.562	106.11	104.437	100.01	105.46
DIFERENCIA %	-4.384	-4.042	-1.929	-1.19	-7.55
72 HORAS	104.6	106.195	98.616	104.33	98.66
DIFERENCIA %	-3.422	-4.127	3.892	-5.51	-0.75

TABLA 21 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura ambiente.

METILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	99.96	100.241	100.491	98.78	98.52
24 HORAS	102.434	102.617	102.795	98.43	106.42
DIFERENCIA %	-2.474	-2.376	-2.304	0.35	-7.9
48 HORAS	103.403	103.214	102.168	99.44	106.25
DIFERENCIA %	-3.443	-2.973	-1.677	-0.66	-7.73
72 HORAS	103.221	104.824	97.099	104.15	98.76
DIFERENCIA %	-3.261	-4.583	3.392	-5.37	-0.24

TABLA 22 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura ambiente.

PROPILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	98.77	99.218	99.619	98.37	96.96
24 HORAS	102.312	102.853	103.162	99.45	106.11
DIFERENCIA %	-3.542	-3.635	-3.543	-1.08	-9.15
48 HORAS	103.452	103.245	102.365	101.42	108.85
DIFERENCIA %	-4.682	-4.027	-2.746	-3.05	-11.89
72 HORAS	101.576	102.999	95.57	104.93	98.37
DIFERENCIA %	-2.806	-3.781	4.049	-6.56	-1.41

TABLA 23 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura de refrigeración.

FOMINO BEN

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	102.572	101.062	97.647	98.82	97.91
24 HORAS	102.104	99.594	100.827	101.74	101.73
DIFERENCIA %	0.468	1.468	-3.18	-2.92	-3.82
48 HORAS	101.185	104.434	104.398	99.6	102.21
DIFERENCIA %	1.387	-3.372	-6.751	-0.78	-4.3
72 HORAS	103.432	103.129	102.048	103.49	100.15
DIFERENCIA %	-0.86	-2.067	-4.401	-4.67	-2.24

TABLA 24 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura de refrigeración.

METILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	100.279	99.858	97.399	98.78	98.52
24 HORAS	99.88	102.128	100.495	101.49	104.01
DIFERENCIA %	0.399	-2.27	-3.096	-2.71	-5.49
48 HORAS	98.802	101.379	101.373	99.14	101.99
DIFERENCIA %	1.477	-1.521	-3.974	-0.36	-3.47
72 HORAS	101.575	102.278	101.908	103.18	100.3
DIFERENCIA %	-1.296	-2.42	-4.509	-4.4	-1.78

TABLA 25 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura de refrigeración.

PROPILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	99.368	98.806	96.058	98.37	96.96
24 HORAS	100.131	99.324	100.306	102.61	103.08
DIFERENCIA %	-0.763	-0.518	-4.248	-4.24	-6.12
48 HORAS	98.751	101.287	101.343	100.89	104.3
DIFERENCIA %	0.617	-2.481	-5.285	-2.52	-7.34
72 HORAS	100.151	100.555	100.089	103.93	99.89
DIFERENCIA %	-0.783	-1.749	-4.031	-5.56	-2.93

Dado que las muestras no fueron estables a las 24, 48 y 72 horas, se procedió a analizar las muestras a las 12 horas para observar si son estables a este tiempo, por lo que se repitió al análisis con distintas soluciones de referencia y de las muestras de la suspensión oral.

Los resultados se presentan en las tablas 26 a 31.

TABLA 26 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura ambiente.

FOMINO BEN

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	102.071	101.792	104.983	101.62	100.2
12 HORAS	103.737	103.554	104.748	101.97	103.14
DIFERENCIA %	-1.666	-1.762	0.235	-0.35	-2.94

TABLA 27 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura ambiente.

METILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	101.6	100.645	103.076	101.5	100.29
12 HORAS	103.518	102.444	102.546	101.41	104.49
DIFERENCIA %	-1.918	-1.799	0.53	0.09	-4.2

TABLA 28 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura ambiente.

PROPILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	100.977	100.066	102.602	101.71	99.96
12 HORAS	103.713	103.033	103.113	100.14	101.52
DIFERENCIA %	-2.736	-2.967	-0.511	1.57	-1.56

TABLA 29 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura de refrigeración.

FOMINO BEN

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	101.258	103.112	103.168	101.62	100.2
12 HORAS	100.429	103.407	101.241	98.12	100.78
DIFERENCIA %	0.829	-0.295	1.927	3.5	-0.58

TABLA 30 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura de refrigeración.

METILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	102.017	102.047	101.426	101.5	100.29
12 HORAS	101.549	102.783	98.963	98.59	101.18
DIFERENCIA %	0.468	-0.736	2.463	2.91	-0.89

TABLA 31 Estabilidad de muestras y referencias a temperatura de refrigeración.

PROPILPARABENO

CONDICIÓN	MTA 1	MTA 2	MTA 3	STD 1	STD 2
INICIAL	100.89	101.289	101.005	101.71	99.96
12 HORAS	101.709	103.327	99.8	100.14	101.52
DIFERENCIA %	-0.819	-2.038	1.205	1.57	-1.56

Al analizar los datos se encontró que ni la solución de referencia ni las soluciones de las muestras de suspensión, son estables después de 12 horas, por lo que ambas soluciones deberán ser preparadas el día del análisis y analizadas inmediatamente.

4.9. Estabilidad en la fase móvil.

En las tablas 32 a 34 se muestran los valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para fominoben, metilparabeno y propilparabeno al utilizar la fase móvil almacenada en los tiempos especificados en la sección 3.2.10 a temperatura ambiente.

TABLA 32

FOMINO BEN Temperatura ambiente					
PARAMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	RESULTADO
DIAS	0	2	7	---	
C.V. (%)	1.9	1.8	1.2	2.0	CUMPLE
No. Platos teóricos	2532.52	2612.71	2776.00	$n > n_i - 20\%$	CUMPLE
Coleo	1.2	1.2	1.3	0.5 - 1.5	CUMPLE
Factor de capacidad	5.541	5.743	5.713	$k' + 50\%$	CUMPLE
Resolución	10.6	10.8	11.1	> 3	CUMPLE

TABLA 33

METILPARABENO Temperatura ambiente					
PARAMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	RESULTADO
DIAS	0	2	7	---	
C.V. (%)	1.8	1.9	1.2	2.0	CUMPLE
No. Platos teóricos	1057.29	1105.14	1005.87	$n > n_i - 20\%$	CUMPLE
Coleo	1.3	1.3	1.4	0.5 - 1.5	CUMPLE
Factor de capacidad	0.200	0.200	0.200	$k' + 50\%$	CUMPLE
Resolución	---	---	---	> 3	CUMPLE

TABLA 34

PROPILPARABENO Temperatura ambiente					
PARAMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	RESULTADO
DIAS	0	2	7	---	
C.V. (%)	1.9	1.7	1.1	2.0	CUMPLE
No. Platos teóricos	1969.82	2036.00	2059.25	$n > n_i - 20\%$	CUMPLE
Coleo	1.2	1.2	1.3	0.5 - 1.5	CUMPLE
Factor de capacidad	1.600	1.671	1.663	$k' + 50\%$	CUMPLE
Resolución	7.7	7.9	7.9	> 3	CUMPLE

A partir de los datos obtenidos al mantener la fase móvil a temperatura ambiente, se encontró que los parámetros de adecuabilidad del sistema no varían significativamente, por lo que la fase móvil puede almacenarse hasta por 7 días sin que se vean afectados los resultados del análisis.

En las tablas 35 a 37 se muestran los valores de los parámetros cromatográficos obtenidos para fominoben, metilparabeno y propilparabeno al utilizar la fase móvil almacenada en refrigeración a los tiempos especificados en la sección 4.2.10.

TABLA 35

FOMINO BEN Temperatura refrigeración					
PARAMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	RESULTADO
DIAS	0	2	7	---	
C.V. (%)	1.9	1.7	1.3	2.0	CUMPLE
No. Platos teóricos	2532.52	2667.14	2821.12	$n > n_i - 20\%$	CUMPLE
Coleo	1.2	1.2	1.3	0.5 - 1.5	CUMPLE
Factor de capacidad	5.541	5.743	5.750	$k' + 50\%$	CUMPLE
Resolución	10.6	10.9	11.2	> 3	CUMPLE

TABLA 36

METILPARABENO Temperatura refrigeración					
PARAMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	RESULTADO
DIAS	0	2	7	---	
C.V. (%)	1.8	1.8	1.3	2.0	CUMPLE
No. Platos teóricos	1057.29	1086.42	1025.12	$n > n_i - 20\%$	CUMPLE
Coleo	1.2	1.3	1.4	0.5 - 1.5	CUMPLE
Factor de capacidad	0.200	0.200	0.200	$k' + 50\%$	CUMPLE
Resolución	---	---	---	> 3	CUMPLE

TABLA 37

PROPILPARABENO Temperatura refrigeración					
PARAMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	RESULTADO
DIAS	0	2	7	---	
C.V. (%)	1.9	2	2.5	2.0	NO CUMPLE
No. Platos teóricos	1969.82	2063.57	2047.50	$n > n_i - 20\%$	CUMPLE
Coleo	1.2	1.2	1.3	0.5 - 1.5	CUMPLE
Factor de capacidad	1.600	1.700	1.688	$k' + 50\%$	CUMPLE
Resolución	7.7	7.9	7.9	> 3	CUMPLE

A partir de los datos obtenidos se encontró que los parámetros de la adecuación del sistema varían significativamente, y no cumplen con los criterios establecidos, por lo que en refrigeración la fase móvil sólo es estable durante 2 días.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

Se validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de fominoben en una suspensión oral. Para ello se utilizó una columna Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m) 125-3mm, como fase móvil de buffer de fosfatos Sorensen y acetonitrilo HPLC (60:40) y detector de UV a 255 nm. Los parámetros evaluados fueron:

- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Exactitud del método
- Precisión del método (Repetibilidad)
- Reproducibilidad (Precisión Intermedia))
- Límites de detección y de cuantificación
- Tolerancia
- Estabilidad de muestras y referencias
- Estabilidad de la fase móvil

Los resultados obtenidos permitieron concluir que:

- El método analítico para cuantificación de fominoben, de metilparabeno y de propilparabeno fué específico, ya que no existen interferencias en los picos de interés.
- El método analítico fue lineal en el intervalo de concentración de 40 a 160 % de la concentración teórica.
- El método analítico fue exacto en el intervalo de concentración de 80 a 120 % de la concentración teórica.
- El método analítico fue preciso (repetible) y además cumplió con los criterios de aceptación para reproducibilidad (precisión intermedia) en los tres compuestos de interés.
- El método analítico fue tolerante a cambios en el tipo de filtros y en el tipo de columna.

- Las soluciones de las muestras y las soluciones de referencia no fueron estables después de 12 horas, por lo que es necesario preparar y hacer el análisis el mismo día.
- La fase móvil fue estable a temperatura ambiente por 7 días.

Por lo tanto, el método analítico validado puede ser utilizado en el Laboratorio de Control de Calidad, para la cuantificación de fominoben, de metilparabeno y de propilparabeno en una suspensión oral.

Capítulo 6

Referencias Bibliográficas

1. The Merck Index. White House Station, Chapman and Hall, twelfth edition, USA (1996), pp. 750, 1088, 1406.
2. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. PLM. Edición 49, México (2003), Versión CD.
3. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. FEUM. 7ª Edición, México, 2000, pp. 560, 576.
4. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C., (2002).
5. U.S. Pharmacopoeia 25 National Formulary, Printed by National Publishing, Philadelphia (2002), pp. 2256-2259.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico-farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Diario Oficial de la Federación
7. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen pruebas. Diario Oficial de la Federación.
8. Prescripción de Análisis No. 900 0203-01 del 29.05.1991 para Fominoben Suspensión, Boehringer Ingelheim Promeco.
9. CRAWLEY, J.N, BLUMSTEIN, L.K, BALDINO, F. Jr, Anxiolytic-like properties of fominoben. European J. Pharmacol. (1984); 27; 97(3-4):277-281.
10. JAUCH, R, ZIMMER, A, BESCHKE, K, BUCHELER, A, KASCHKE, S, Pharmacokinetics of oxiethyltheophylline and fominoben hydrochloride in Man (author's transl). Arzneimittelforschung. (1978); 28(4):693-697.
11. KIBBE, Arthur H. , Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, 3a Ed., pp. 340-343 y 450-453.
12. KOCH, G., Effects of Fominoben-HCl on circulation, pulmonary gas exchange and acid-base balance at rest and during exercise. Arzneimittelforschung. (1976); 26(3):438-441.

13. LEHMANN, H., Reproduction-toxicological studies with fominoben-HCl. *Arzneimittelforschung.* (1974); 24(11):1813-1816.
14. MARTINDALE, The Extra Pharmacopoeia, Royal Pharmaceutical Society, 31 Edición, London, (1996), pp. 1059, 1068, 1135, 1136.
15. NAKANISHI, S, SHIOHARA, E, TSUKADA, M, KAWAHARA, I, MATSUMURA, R, NAGAKURA, A, KOHEI, H, Effects of Fominoben-HCl on rat liver. *Arzneimittelforschung.* (1980); 30(11):1884-1887.
16. PAPPITZ, G, BAUER, M, SERBEDIJA, R, UEBERBERG, H, Experimental Studies in animals on the toxicity of fominoben-HCl. *Arzneimittelforschung.* (1974); 24(11):1816-1821.
17. PATSCH, J, Measurement of global diffusion capacity for CO, membrane diffusion capacity for CO and capillary blood volume in patients with bronchial emphysema after fominoben-HCl. Short and long time trials (author's transl). *Arzneimittelforschung.* (1979); 29(2):340-343.
18. SCHOLTZE, J, Therapeutic results in chronic airways obstruction of a combination of oxyethyltheophylline and fominoben by injection and infusion (author's transl). *Arzneimittelforschung.* (1979); 29(2):337-340.
19. SIEMON, G, THOMA, R, The effect of fominoben and oxyethyltheophylline in combination on pulmonary function and pulmonary hemodynamics in chronic-obstructive diseases of the airways (author's transl). *Arzneimittelforschung.* (1978); 28(4):698-700.
20. VOLPEL, S, LICHTENAUER, I, EICHLER, J, On the respiration analeptic effect of fominoben-HCl after administration of Pethidine/Promethazine. *Arzneimittelforschung.* (1979); 29(2):334-336.
21. ZIMMER, A, KRUGER, G, PROX, A, STHAL, E, WOLTER, B, WACHSMUTH, H, KOSTER, P, Studies of the biotransformation of fominoben-HCl in man (author's transl). *Arzneimittelforschung.* (1978); 28(4):688-692.
22. ZIMMER, A, Pharmacokinetics of fominoben-HCl in the dog and the rabbit (author's transl). *Arzneimittelforschung.* (1979); 29(2):323-328.
23. ZIMMER, A, Pharmacokinetics and metabolism of fominoben (Noleptan) in man. *Arzneimittelforschung.* (1973); 23(12):1798-1801.

APENDICE A.

Fórmulas utilizadas para el cálculo del límite de detección y el límite de cuantificación en la validación del método analítico para determinar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en una suspensión oral.

b_1 = pendiente entre concentración en $\mu\text{g/mL}$ (X) y respuesta obtenida (Y).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2 - b_1) * (\sum XY - b_0) * \sum Y}{8}}$$

$$b_0 = \frac{(\sum Y - b_1) * \sum X}{n}$$

$$LD = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 * S_{y/x}}{b_1}$$

b_1 = Pendiente

b_0 = Ordenada al origen

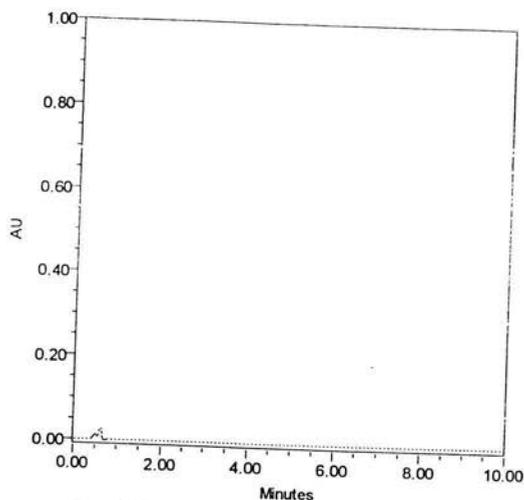
$S_{y/x}$ = Desviación estándar de regresión

LD = Límite de detección

LC = Límite de cuantificación

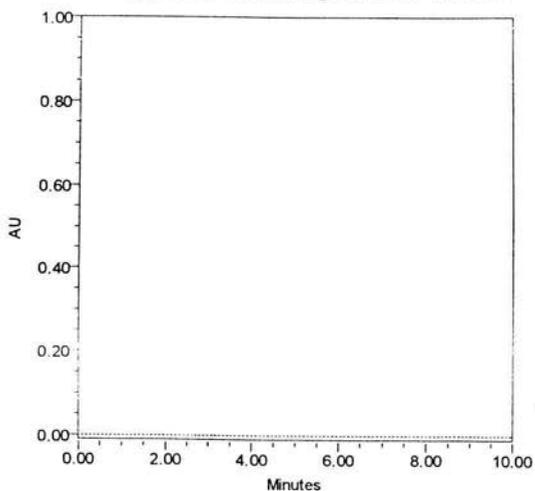
APENDICE B.

Cromatogramas resultantes de la validación del método analítico para cuantificar fominoben, metilparabeno y propilparabeno en una suspensión oral.



SampleName BLANCO Vial 30 Injection 2 Date
Acquired Martes 06 de Enero de 2004 04:41:08 PM
Injection Volume 20.00 Channel Name 486

Figura 9. Cromatograma de Blanco



SampleName FASE MOVIL Vial 31 Injection 5 Date
Acquired Martes 06 de Enero de 2004 06:23:39 PM
Injection Volume 20.00 Channel Name 486

Figura 10. Cromatograma de Fase Móvil

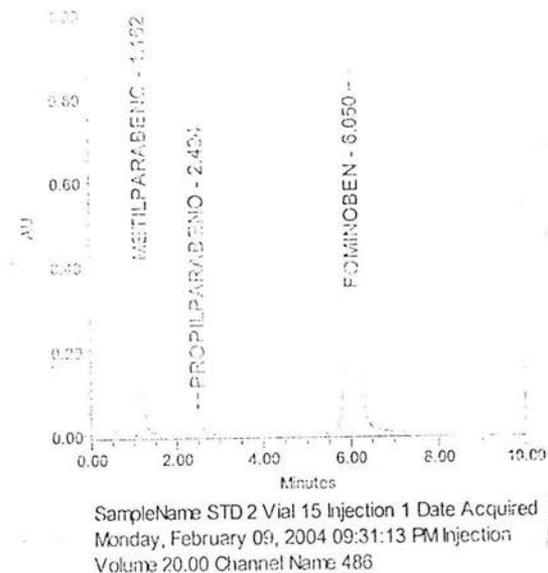


Figura 11. Cromatograma de solución de referencia al 100%

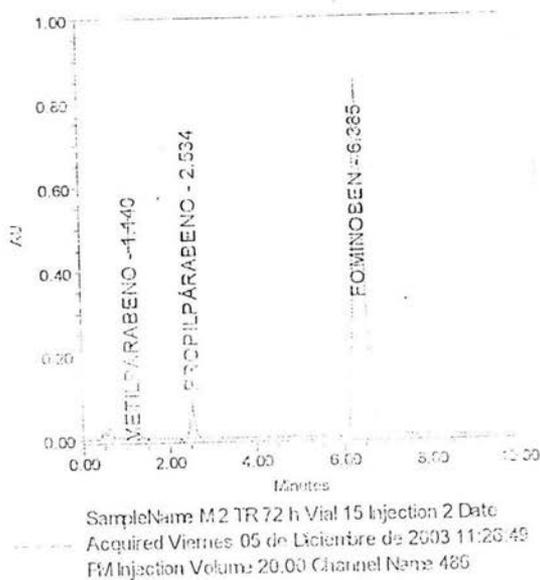


Figura 12. Cromatograma de la solución de la muestra del producto (suspensión que contiene fominoben, metilparabeno y propilparabeno)

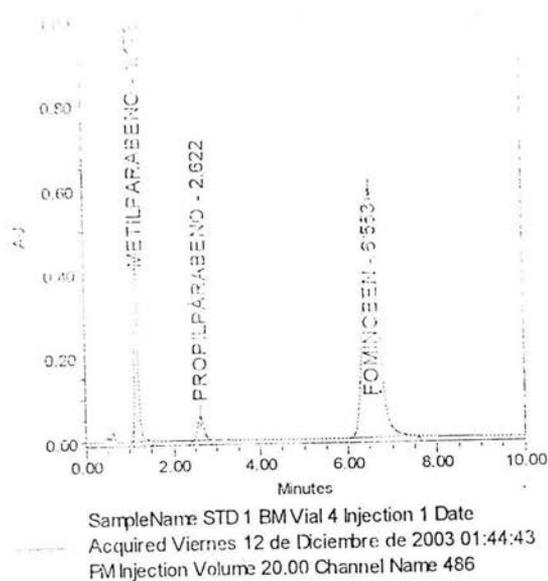


Figura 13. Cromatograma de la solución de referencia al 100% sometida a condiciones de Baño María

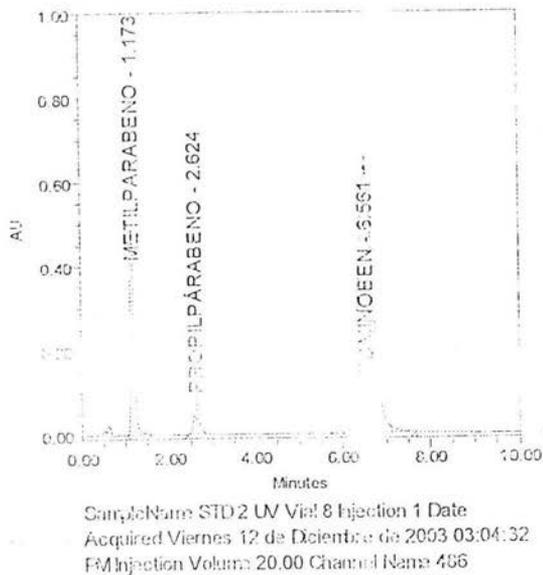


Figura 14. Cromatograma de la solución de referencia al 100% sometida a condiciones de luz U.V.

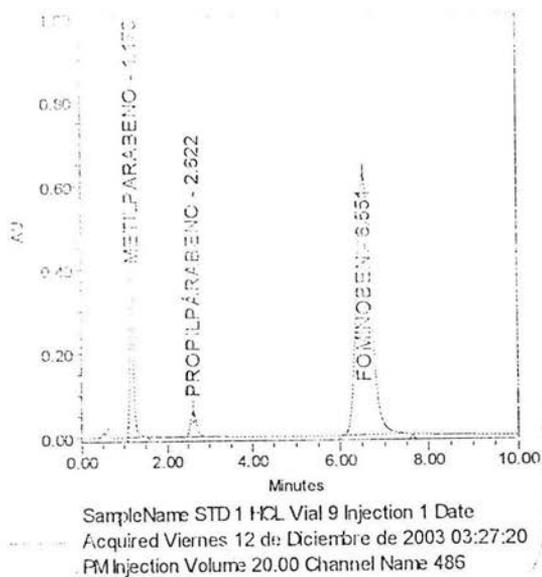


Figura 15. Cromatograma de la solución de referencia al 100 % adicionada con HCl 1 N

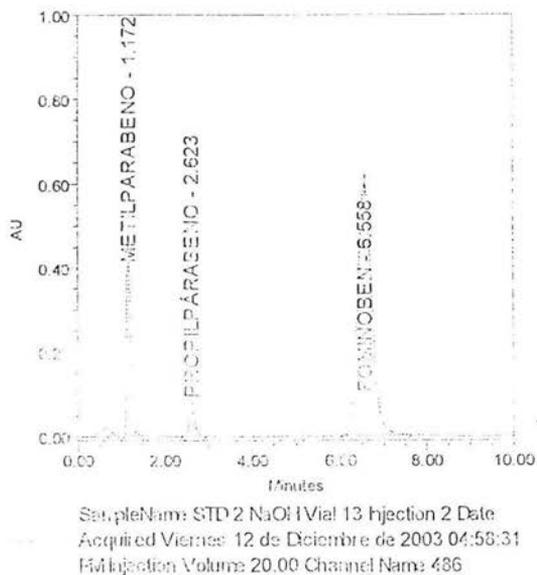


Figura 16. Cromatograma de la solución de referencia al 100 % adicionada con NaOH 1N

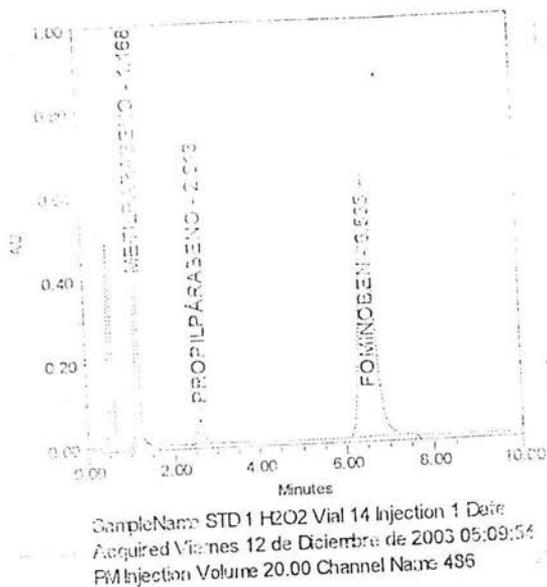


Figura 17. Cromatograma de la solución de referencia al 100% adicionada con H_2O_2

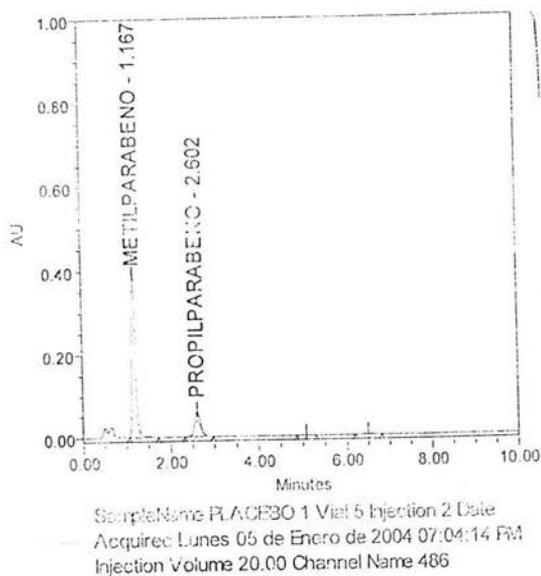


Figura 18. Cromatograma del placebo de la suspensión oral.

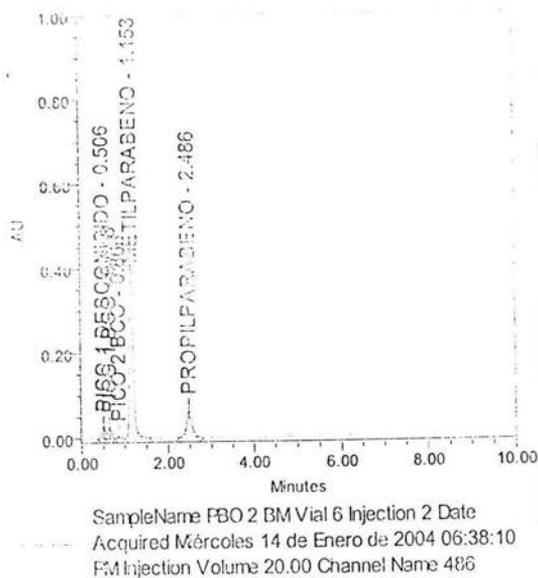


Figura 19. Cromatograma del placebo sometido a condiciones de Baño María

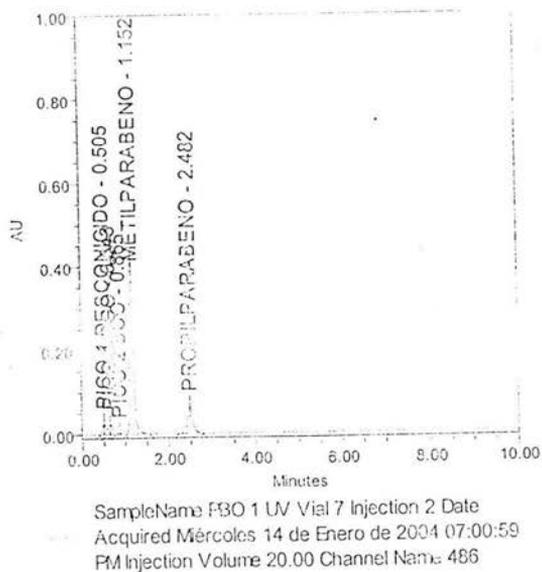


Figura 20. Cromatograma del placebo sometido a condiciones de luz U.V.

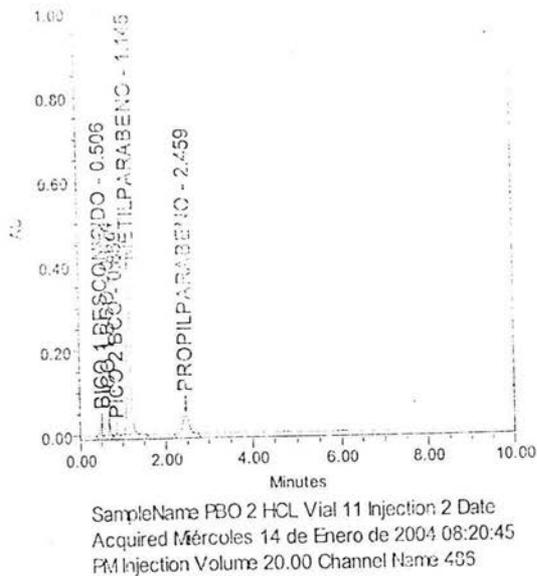


Figura 21. Cromatograma del placebo adicionado con HCl 1 N

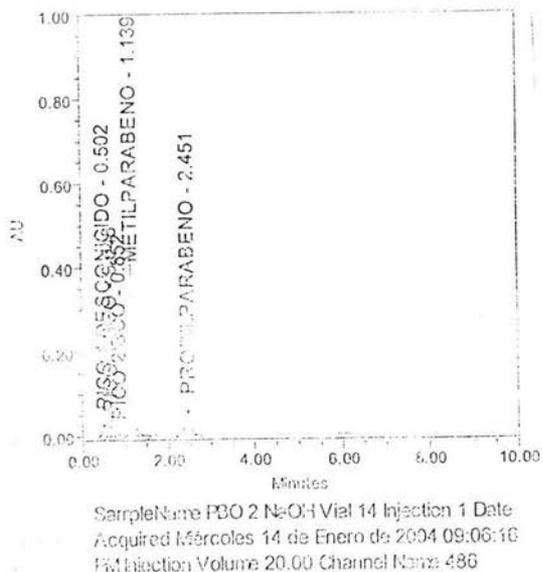


Figura 22. Cromatograma del placebo adicionado con NaOH 1 N

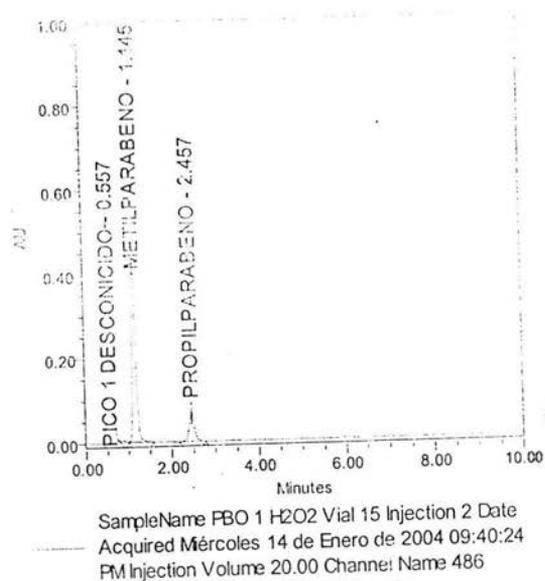


Figura 23. Cromatograma del placebo adicionado con H₂O₂

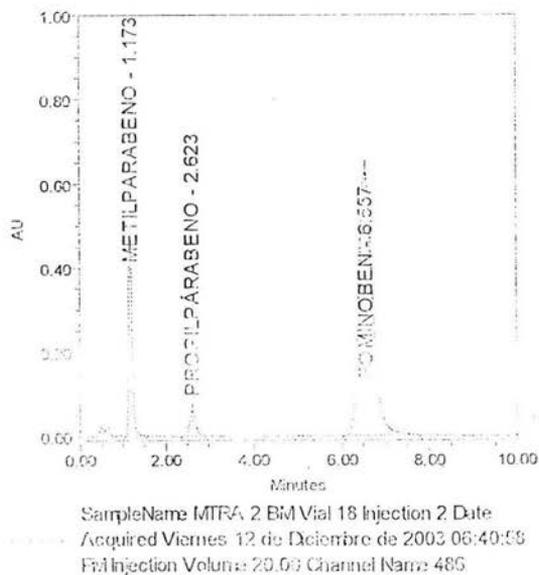


Figura 24. Cromatograma de la solución de la muestra del producto sometida a condiciones de Baño María

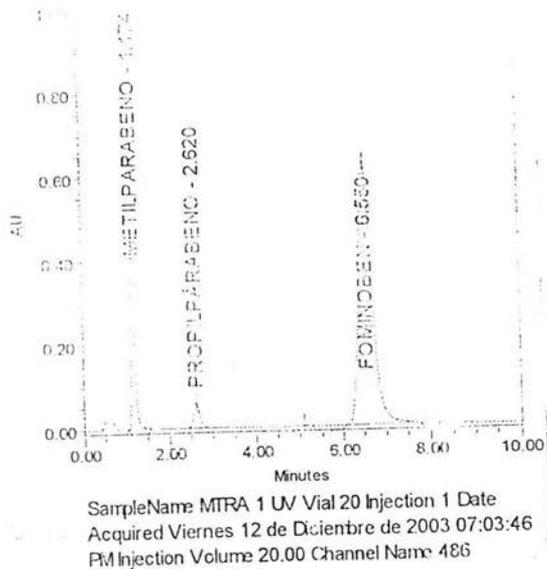


Figura 25. Cromatograma de la solución de la muestra del producto sometida a condiciones de luz U.V.

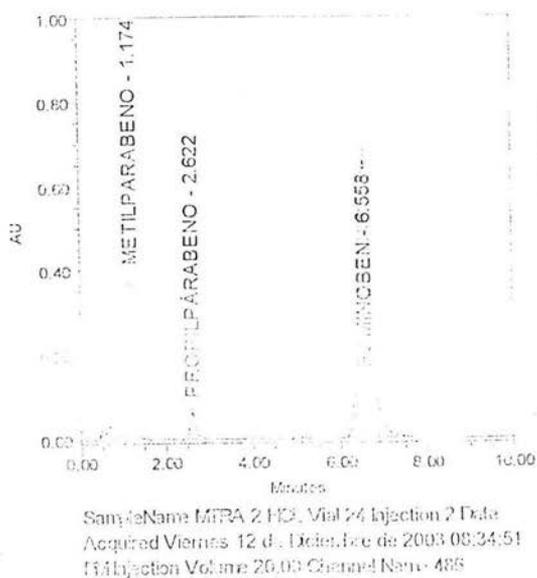


Figura 26. Cromatograma de la solución de la muestra del producto adicionada con HCl 1 N

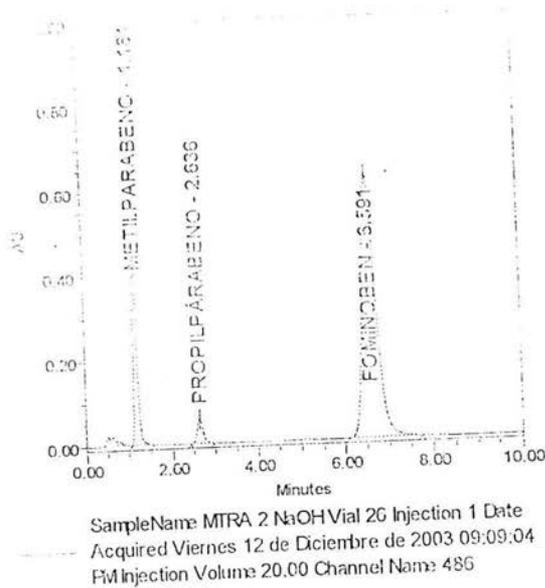


Figura 27. Cromatograma de la solución de la muestra del producto adicionada con NaOH 1 N

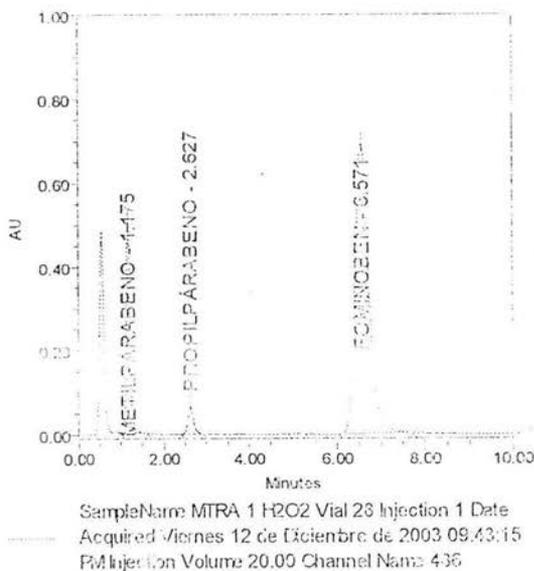


Figura 28. Cromatograma de la solución de la muestra del producto adicionada con H₂O₂

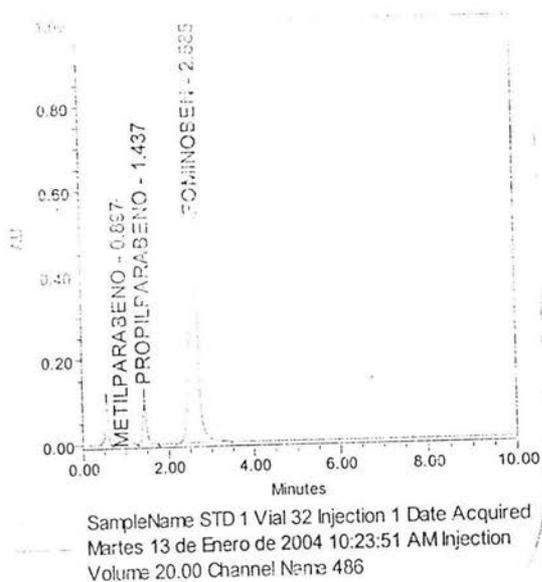


Figura 29. Cromatograma de la fase móvil de buffer sorensen-acetonitrilo 50:50

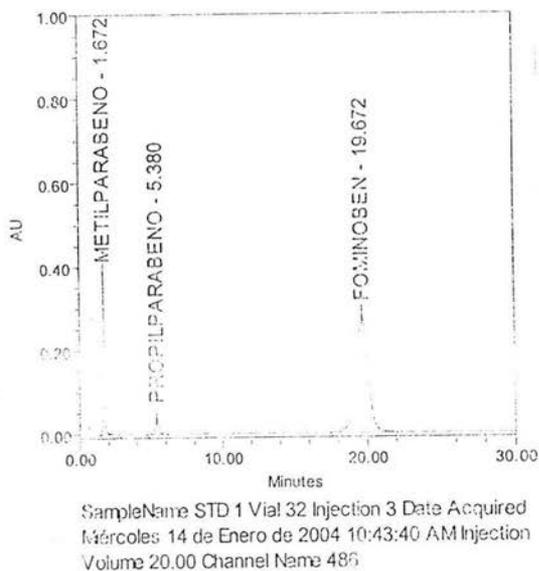


Figura 30. Cromatograma de la fase móvil de buffer sorensen-acetonitrilo 70:30

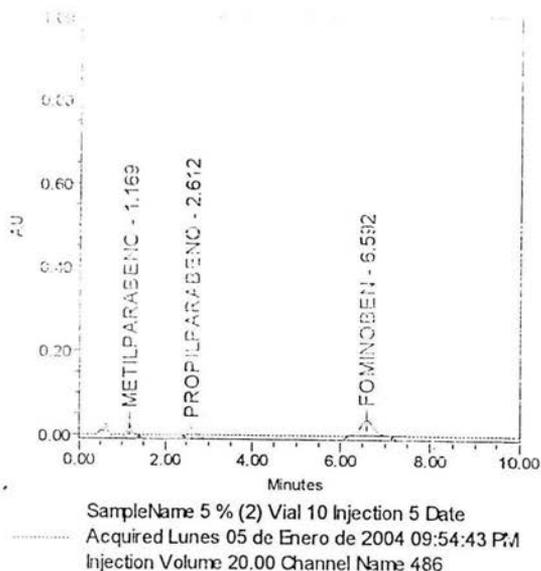


Figura 31. Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 5 % de la cantidad teórica.

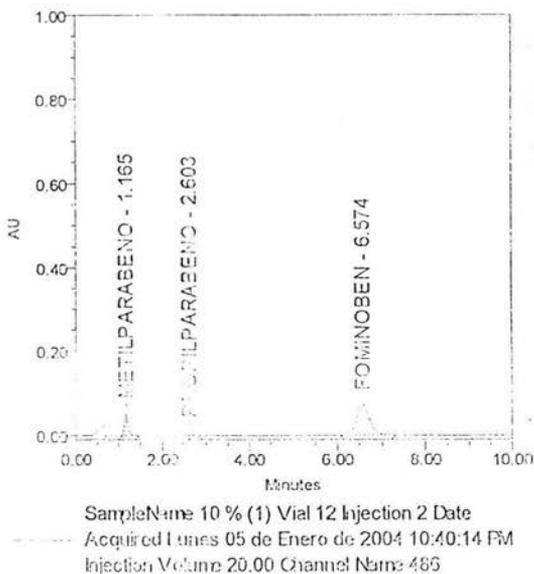


Figura 32. Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 10 % de la cantidad teórica.

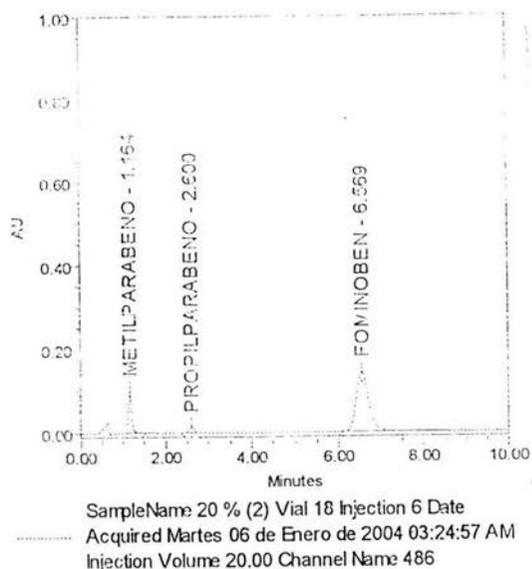


Figura 33. Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 20 % de la cantidad teórica.

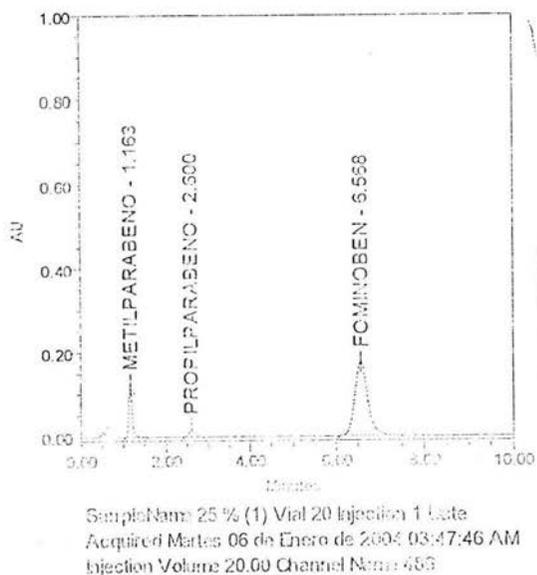


Figura 34. Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 25 % de la cantidad teórica.

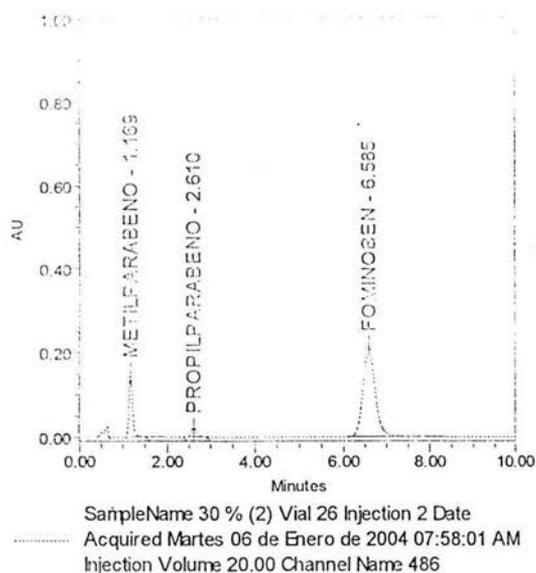


Figura 35. Cromatograma de Límites de Detección y de Cuantificación con una concentración del 30 % de la cantidad teórica.

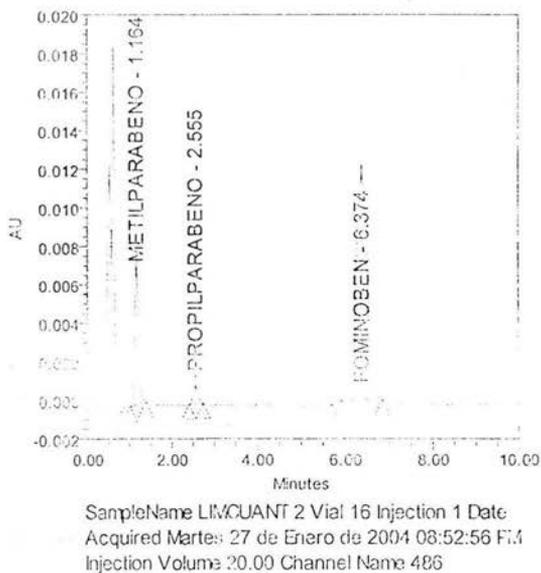


Figura 36. Cromatograma de la prueba de confirmación del Límite de Cuantificación encontrado.

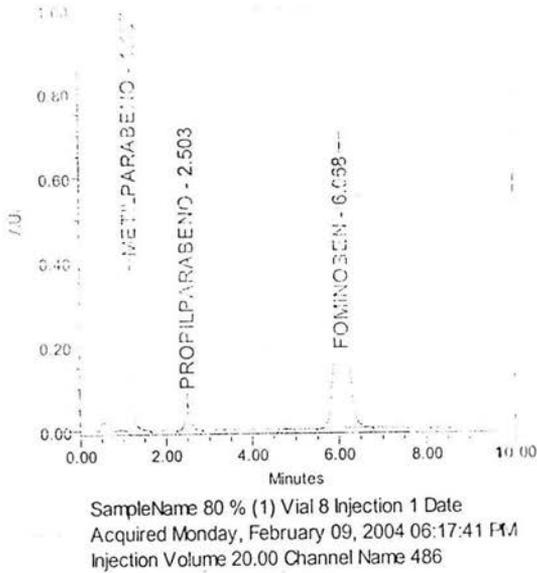


Figura 37. Cromatograma del Placebo Cargado con 80 % de la concentración teórica del principio activo y de los conservadores contenidos en la suspensión oral.

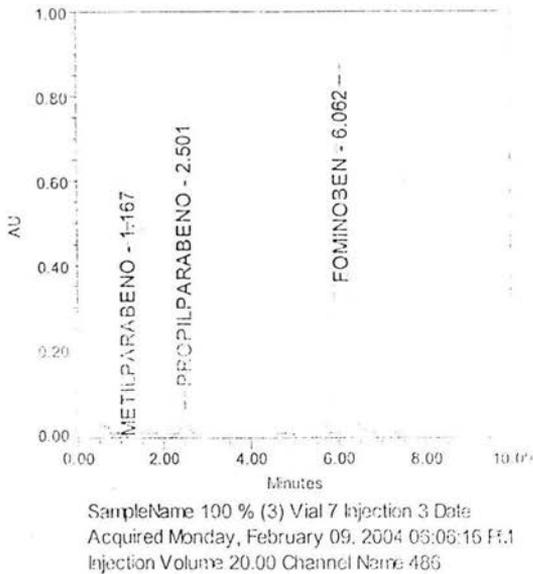
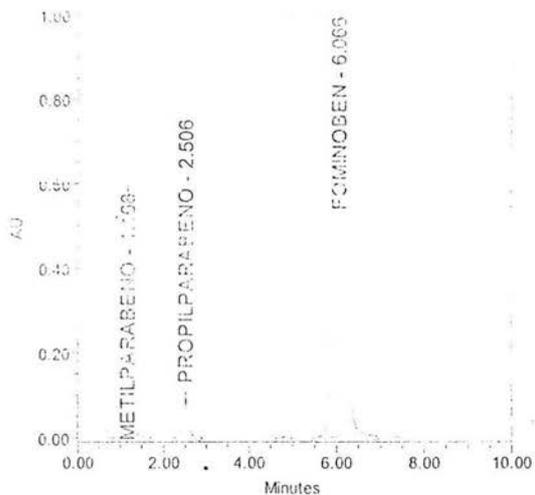


Figura 38. Cromatograma del Placebo Cargado con 100 % de la concentración teórica del principio activo y de los conservadores contenidos en la suspensión oral.



SampleName 120 % (1) Vial 13 Injection 3 Date
 Acquired Monday, February 09, 2004 08:45:43 PM
 Injection Volume 20.00 Channel Name 485

Figura 39. Cromatograma del Placebo Cargado con 120 % de la concentración teórica del principio activo y de los conservadores contenidos en la suspensión oral.