



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**



TESIS

**Desarrollo y validación de un método analítico por C. L. A. R., para cuantificar
Clorhidrato de Bromhexina en cápsulas y suspensiones e identificar
conservadores en las suspensiones**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Angélica Leticia Merlo Robredo

MÉXICO, D.F.



2005

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

m. 341905



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Angelica Leticia Merlo Robredo

FECHA: 07 MARZO 2005

FIRMA: Angelica L. Merlo Robredo

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Georgina Margarita Maya Ruiz
Vocal	Prof. Honoria Fuentes Sixtos
Secretario	M en C. Juan Manuel Rodríguez
1er. Suplente	Prof. Ricardo Rodríguez Saenz
2do. Suplente	Prof. Ernestina Hernández García


Laboratorio de Biofarmacia

Departamento de Farmacia

Facultad de Química Edificio E, Lab. 113

UNAM

Asesor del tema:


M en C. Juan Manuel Rodríguez

Sustentante:


Angelica Leticia Merlo Robredo

DEDICATORIA

A mis padres Angélica y Alfredo por el amor y agradecimiento inmenso que les tengo.

A Perico porque fue una persona muy importante en mi vida y sé que le hubiera encantado estar conmigo en esta etapa de mi vida.

A Israel por el amor tan grande que siento por él.

Agradecimientos

A mis padres por el apoyo y amor incondicional en esta etapa tan importante en mi vida.

A Israel por el apoyo, comprensión, amor y por aguantarme en mis momentos de tensión.

A Alfredo, Lupita y Luis Alfredo por contar con ustedes.

A Olga y al profesor Juan Manuel por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.

A Tere por la paciencia, ayuda, comprensión y tiempo que me dedicó.

A Julio por sacarme de mis dudas y alentarme siempre a seguir adelante.

A Jannet por su trabajo y consejos.

A Ma. Carmen por su apoyo.

A la Familia M. Reséndiz por su confianza en mi trabajo.

A Karla porque a pesar de la distancia siempre está conmigo.

A mis tios, tías, amigos y amigas por su confianza y sincera amistad.

Índice General

Introducción	1
1.-Generalidades	
1.1.- Clorhidrato de Bromhexina	2
1.2.-Cromatografía	6
1.2.1.- Cromatografía de líquidos de alta resolución	7
1.3. -Método analítico	13
1.4 .- Desarrollo del método de separación	13
1.5.- Validación de métodos analíticos	14
1.5.1.- Adecuabilidad del sistema	15
1.5.2.- Selectividad	16
1.5.3.- Linealidad	16
1.5.4.- Exactitud	16
1.5.5.- Precisión	16
1.5.5.1.- Repetibilidad	16
1.5.5.2. -Precisión intermedia	16
1.5.6.- Estabilidad	17
1.5.7. -Tolerancia	17
1.5.8. -Limite de detección	17
1.5.9.- Limite de cuantificación	17
2.-Parte experimental	
2.1. -Recursos materiales	18
2.1.1.- Estándares	18
2.1.2.- Reactivos	18
2.1.3.- Equipos	18
2.1.4. - Columnas cromatográficas	19
2.1.5.- Material de vidrio	19
2.2. -Preparación de soluciones	19
2.3.-Desarrollo del método analítico	24
2.4. -Protocolo de validación	27
2.4.1.- Adecuabilidad del sistema	27
2.4.2.-Selectividad	27
2.4.3.-Linealidad del sistema	28
2.4.4. -Precisión del sistema	29
2.4.5. -Linealidad del método	29
2.4.6. -Exactitud del método	29
2.4.7. -Precisión del método	30
2.4.7.1.- Repetibilidad	30
2.4.7.2. -Precisión intermedia	30
2.4.8. -Tolerancia	30
2.4.9.- Estabilidad	31
2.4.9.1.-De fase móvil	31
2.4.9.2.- De estándares	31
2.4.9.3.- De muestras	31
2.4.10. -Limite de detección (L.D.)	32
2.4.11.- Limite de cuantificación (L.C.)	33

3.- Resultados y discusión	
3.1. -Desarrollo del método analítico	34
3.2. -Validación del método analítico	44
3.2.1. -Adecuabilidad del sistema	44
3.2.2. -Selectividad	46
3.2.3. -Linealidad del sistema	50
3.2.4. -Precisión del sistema	52
3.2.5. - Linealidad del método	52
3.2.6. -Exactitud del método	58
3.2.7.- Precisión	62
3.2.7.1.- Repetibilidad	62
3.2.7.2.- Precisión intermedia	65
3.2.8.- Estabilidad	68
3.2.8.1.- Estándares de Clorhidrato de Bromhexina al 100%	68
3.2.8.2. -Muestras	69
3.2.8.3.- Fase móvil	73
3.2.9.-Tolerancia	74
3.2.10. -Límite de detección	78
3.2.11.- Límite de cuantificación	79
Conclusiones	81
Apéndice	82
Bibliografía	97

Índice de Figuras

1.- Estructura química del Clorhidrato de Bromhexina	2
2.- Productos de degradación de la Bromhexina	3
3.- Equipo de Cromatografía de Líquidos de alta Resolución	8
4.- Cromatograma obtenido por C.L.A.R	10
5.- Estructura de un procedimiento analítico	13
6.- Proceso de muestreo	25
7.- Proceso de tratamiento de la muestra	25
8.- Cromatograma al reproducir el proceso de medición bibliográfico	34
9.- Gráficas: a) Diagrama de Pareto para Tr, B) Efectos principales de los factores, C) Superficie de respuesta	36
10.- Gráfica de contornos para el tiempo de retención	37
11.-Gráficas: a) Diagrama de Pareto para simetría, B) Efectos principales de los factores, C) Superficie de respuesta	38
12.- Gráfica de contornos para la simetría	39
13.- Cromatograma de la solución de mezcla de estándares obtenido con fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (37:63)	42
14.- Cromatograma de la solución de muestra de cápsulas 500mg/8mg	43
15.- Cromatograma de la solución de muestra de suspensión de 250mg/8mg	43
16.- Cromatograma de la solución de Muestra de suspensión de 500mg/8mg	43
17.- Cromatograma de la solución de cápsulas que se sometió a degradación con calentamiento (15 días)	46
18.- Cromatograma de la solución de suspensión de 250mg/8mg que se sometió a degradación con calentamiento	46
19.- Cromatograma de la solución de suspensión de 500mg/8mg que se sometió a degradación con calentamiento	46
20.- Cromatograma de la solución de cápsulas que se sometió a degradación ácida (15 días)	47
21.- Cromatograma de la solución de suspensión de 250mg/8mg que se sometió a degradación ácida (15 días)	47
22.- Cromatograma de la solución de suspensión de 500mg/8mg que se sometió a degradación ácida (15 días)	47
23.- Cromatograma de la solución de cápsulas que se sometió a degradación básica (15 días)	48
24.- Cromatograma de la solución de suspensión de 250mg/8mg que se sometió a degradación básica (15 días)	48
25.- Cromatograma de la solución de suspensión de 500mg/8mg que se sometió a degradación básica (15 días)	48
26.- Cromatograma de la solución de cápsulas que se sometió a degradación con H ₂ O ₂ (15 días)	49
27.- Cromatograma de la solución de suspensión de 250mg/8mg que se sometió a degradación con H ₂ O ₂ (15 días)	49
28.- Cromatograma de la solución de suspensión de 500mg/8mg que se sometió a degradación con H ₂ O ₂ (15 días)	49
29.- Gráfica de Linealidad del sistema	51
30.- Gráfica de linealidad del método para cápsulas	53
31.- Gráfica de linealidad del método para suspensiones de 250mg/8mg	55
32.- Gráfica de linealidad del método para suspensiones de 500mg/8mg	57
33.- Cromatograma blanco	82
34.- Cromatograma de la solución de Clorhidrato de Bromhexina	82
35.- Cromatograma de la solución de Benzoato de sodio	82
36.- Cromatograma de la solución de Metil-4-hidroxibenzoato	83
37.- Cromatograma de la solución de Propil-4-hidroxibenzoato	83
38.- Cromatograma de la solución de placebo de cápsulas + ampicilina	83
39.- Cromatograma de la solución de placebo de suspensión de 500mg/8mg + ampicilina	84
40.- Cromatograma de la solución de Clorhidrato de Bromhexina que se calentó (15 días)	84

41.- Cromatograma de la solución de Benzoato de sodio que se calentó (15 días)	84
42.- Cromatograma de la solución de Metil-4-hidroxibenzoato que se calentó (15 días)	85
43.- Cromatograma de la solución de Propil-4-hidroxibenzoato que se calentó (15 días)	85
44.- Cromatograma de la solución de Ampicilina que se calentó (15 días)	85
45.- Cromatograma de la solución de placebo de cápsulas que se calentó (15 días)	85
46.- Cromatograma de la solución de placebo de suspensión que se calentó (15 días)	86
47.- Cromatograma de la solución de Clorhidrato de Bromhexina con HCl 1N (15 días)	86
48.- Cromatograma de la solución de Benzoato de sodio con HCl 1 N (15 días)	86
49.- Cromatograma de la solución de Metil-4-hidroxibenzoato con HCl 1 N (15 días)	87
50.- Cromatograma de la solución de Propil-4-hidroxibenzoato con HCl 1 N (15 días)	87
51.- Cromatograma de la solución de Ampicilina con HCl 1N (15 días)	87
52.- Cromatograma de la solución de placebo de cápsulas con HCl 1N (15 días)	87
53.- Cromatograma de la solución de placebo de suspensión con HCl 1N (15 días)	88
54.- Cromatograma de la solución de Clorhidrato de Bromhexina con NaOH 1 N (15 días)	88
55.- Cromatograma de la solución de Benzoato de sodio con NaOH 1 N (15 días)	88
56.- Cromatograma de la solución de Metil-4-hidroxibenzoato con NaOH 1 N (15 días)	89
57.- Cromatograma de la solución de Propil-4-hidroxibenzoato con NaOH 1 N (15 días)	89
58.- Cromatograma de la solución de Ampicilina con NaOH 1N (15 días)	89
59.- Cromatograma de la solución de placebo de cápsulas con NaOH 1N (15 días)	90
60.- Cromatograma de la solución de placebo de suspensión con NaOH 1N (15 días)	90
61.- Cromatograma de la solución de Clorhidrato de Bromhexina con H ₂ O ₂ (15 días)	90
62.- Cromatograma de la solución de benzoato de sodio con H ₂ O ₂ (15 días)	91
63.- Cromatograma de la solución de Metil-4-hidroxibenzoato con H ₂ O ₂ (15 días)	91
64.- Cromatograma de la solución de Propil-4-hidroxibenzoato con H ₂ O ₂ (15 días)	91
65.- Cromatograma de la solución de Ampicilina con H ₂ O ₂ (15 días)	92
66.- Cromatograma de la solución de placebo de cápsulas con H ₂ O ₂ (15 días)	92
67.- Cromatograma de la solución de placebo de suspensión con H ₂ O ₂ (15 días)	92

Índice de Tablas

1.- Clasificación de Cromatografía	6
2.- Elementos requeridos para la validación	15
3.- Curva de calibración para linealidad del sistema	22
4.- Curva de calibración para exactitud y linealidad del método	23
5.- Curva de calibración para límite de detección y de cuantificación	23
6.- Condiciones para evaluar tolerancia	31
7.- Datos al reproducir el proceso de medición bibliográfico	34
8.- Resultados diseño experimental	35
9.- Análisis de varianza para Tr	37
10.- Análisis de varianza para simetría	40
11.- Datos obtenidos con fase móvil Acetonitrilo . Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (37:63)	42
12.- Datos de adecuabilidad del sistema para la señal de Clorhidrato de Bromhexina	44
13.- Datos de adecuabilidad del sistema para las señales cromatográficas de Clorhidrato de Bromhexina y de los conservadores	45
14.- Linealidad del sistema	50
15.- Precisión del sistema	52
16.- Linealidad del método para cápsulas	53
17.- Linealidad del método para suspensiones de 250mg/8mg	55
18.- Linealidad del método para suspensiones de 500mg/8mg	57
19.- Exactitud cápsulas 500mg/8mg	59
20.- Exactitud suspensión de 250mg/8mg	60
21.- Exactitud suspensión de 500mg/8mg	61
22.- Repetibilidad Cápsulas de 500mg/8mg	62
23.- Repetibilidad suspensión de 250mg/8mg	63
24.- Repetibilidad suspensión de 500mg/8mg	64
25.- Precisión intermedia cápsulas de 500mg/8mg	65
26.- Precisión intermedia suspensión de 250mg/8mg	66
27.- Precisión intermedia suspensión de 500mg/8mg	67
28.- Estabilidad de soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% en refrigeración	68
29.- Estabilidad de soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% a temperatura ambiente y luz	68
30.- Estabilidad de soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% a temperatura ambiente y oscuridad	69
31.- Estabilidad de soluciones de muestras de cápsulas en refrigeración	69
32.- Estabilidad de soluciones de muestras de cápsulas a temperatura ambiente y luz	70
33.- Estabilidad de soluciones de cápsulas a temperatura ambiente y oscuridad	70
34.- Estabilidad de soluciones de muestras de suspensión de 250mg/8mg en refrigeración	71
35.- Estabilidad de soluciones de muestras de suspensión de 250mg/8mg a temperatura ambiente y luz	71
36.- Estabilidad de soluciones de muestras de suspensión de 250mg/8mg a temperatura ambiente y osc.	71
37.- Estabilidad de soluciones de muestras de suspensión de 500mg/8mg en refrigeración	72
38.- Estabilidad de soluciones de muestras de suspensión de 500mg/8mg a temperatura ambiente y luz	72
39.- Estabilidad de soluciones de muestras de suspensión de 500mg/8mg a temperatura ambiente y osc.	72
40.- Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil a temperatura ambiente	73
41.- Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil en refrigeración	73
42.- Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina en fase móvil a Temp. Ambien.	73
43.- Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina en fase móvil en refrigeración	73

44.- Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato	74
45.- Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina al variar la proporción de la fase móvil	74
46.- Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato al cambiar de columna	75
47.- Parámetros cromatográficos del clorhidrato de Bromhexina al cambiar de columna	75
48.- % recobro en cápsulas de 500 mg / 8 mg al cambiar de columna	75
49.- % de recobro en suspensión de 250 mg / 8 mg al cambiar de columna	76
50.- % de recobro en suspensión de 500 mg / 8mg al cambiar de columna	76
51.- Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato	77
52.- Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina al cambiar el pH	77
53.- % de recobro de Clorhidrato de Bromhexina en los tres productos	78
54.- Límite de detección	78
55.- Límite de cuantificación	79
56.- Repetibilidad al inyectar soluciones estándar de Clorhidrato de Bromhexina a la concentración de 0.182 µg/mL	80
57.- Parámetro cromatográficos del Benzoato de sodio en fase móvil a temperatura ambiente	93
58.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio en fase móvil en refrigeración	93
59.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil a Temp. Ambiente	93
60.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil en refrigeración	93
61.-Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato en fase móvil a Temp. Ambiente	93
62.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato en fase móvil en refrigeración	93
63.-Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio al variar la proporción de la fase móvil	94
64.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato al variar la proporción de la fase móvil	94
65.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato al variar la proporción de la fase móvil	94
66.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio al cambiar de columna	95
67.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato al cambiar de columna	95
68.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato al cambiar de columna	95
69.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio al cambiar el pH	95
70.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato al cambiar el pH	96
71.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato al cambiar el pH	96

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se requiere del desarrollo de métodos analíticos apropiados para evaluar que los productos cumplan con criterios de calidad establecidos para su comercialización.

El uso de un nuevo método analítico debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y una validación bien documentada, que cumpla con los requisitos establecidos por instituciones como la Secretaría de Salud (S.SA.), la cual señala en la NOM-059-SSA1-1993- Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, que se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima.

Por lo que la validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo y fabricación de nuevas formulaciones, así como de las técnicas de análisis de control de calidad farmacéutico.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio que un método analítico es confiable para las aplicaciones analíticas deseadas. La validación se lleva a cabo mediante la evaluación de ciertos parámetros como especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límites de cuantificación y detección, entre otros.

Así el objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (C.L.A.R.) sencillo y selectivo para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en cápsulas y suspensiones e identificar algunos conservadores como benzoato de sodio, metil-4-hidroxibenzoato y propil-4-hidroxibenzoato en las suspensiones.

1.-Generalidades

1.1.- Características del Clorhidrato de Bromhexina

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA

- ESTRUCTURA QUÍMICA ^(1,2)

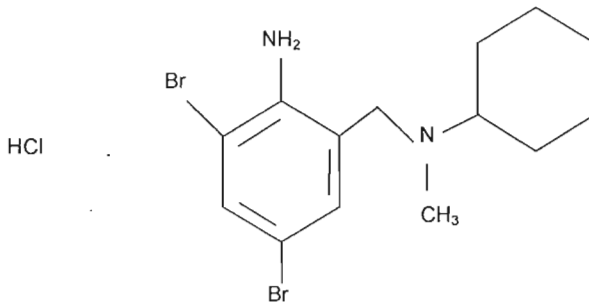
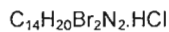


Figura 1.- Estructura química del Clorhidrato de Bromhexina

- FÓRMULA CONDENSADA ^(1,2)



- NOMBRE GENÉRICO

Clorhidrato de Bromhexina

- NOMBRES QUÍMICOS ⁽³⁾

2-Amino-3,5-dibromo-N-ciclohexil-N-metilbencilamino clorhidrato

2-Amino-3,5-dibromobencil(ciclohexil) metil amino clorhidrato

Cloruro de N-ciclohexil-N-metil-(2-amino-3,5) dibromobencilamonio

Clorhidrato de 2-amino-3,5-dibromo-N-ciclohexil-N-metilbencenmetamina

- MASA MOLECULAR ^(1,2)

412.6 g/mol

- DESCRIPCIÓN ^(1,2)

Polvo cristalino blanco o casi blanco.

- SOLUBILIDAD ^(1, 2)

Ligeramente soluble en agua, en alcohol al 96%, metanol y diclorometano.

- INTERVALO DE FUSIÓN

237.5 - 238 °C

- pKa ⁽⁴⁾

8.5

- ESTABILIDAD ⁽⁵⁾

Se estima que bajo condiciones normales de almacenamiento las soluciones acuosas son estables 5 años y más de 10 años en su forma cristalina.

- PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN ⁽⁵⁾

A reflujo con soluciones ácidas o neutras la Bromhexina muestra 4 productos de degradación:

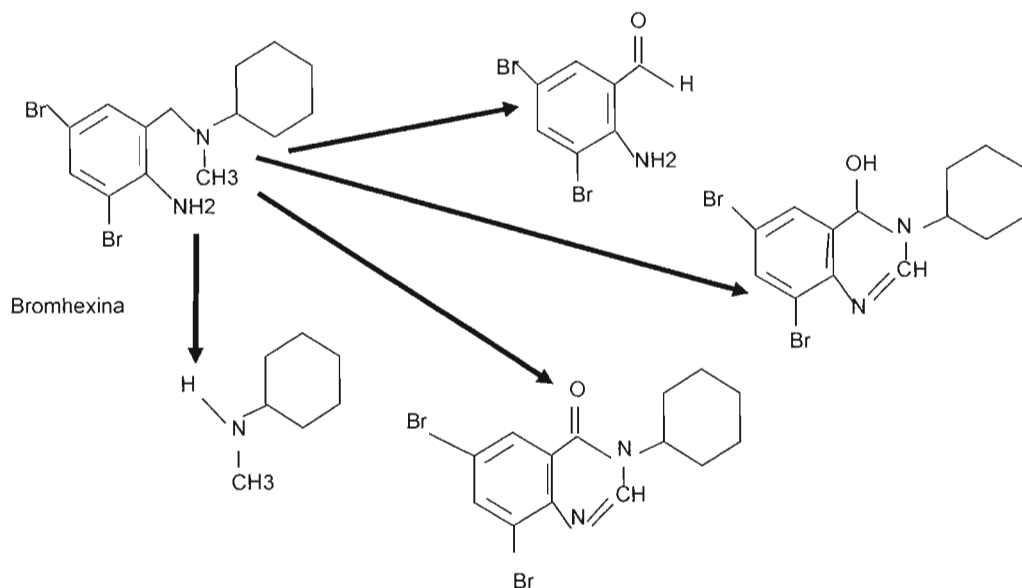


Figura 2.- Productos de degradación de la Bromhexina

- MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICACIÓN

- Análisis volumétrico ⁽¹⁾:

Disolver 0.300 g en 70 mL de alcohol al 96% y añadir 1 mL de HCl 0.1 M. Llevar a cabo una titulación potenciométrica usando NaOH 0.1 M. Leer el volumen añadido entre los dos puntos de inflexión (1 mL de NaOH es equivalente a 41.26 mg de Clorhidrato de Bromhexina).

- Determinación espectrofotométrica:

+ Directa: Se valora en el máximo de absorción que presenta el Clorhidrato de Bromhexina aproximadamente a 317 nm, se compara una muestra con una solución de referencia ⁽⁶⁾.

+ Indirecta: Por análisis del compuesto secundario-colorido (rojo) que se produce al llevarse a cabo la reacción de diazoación entre el Clorhidrato de Bromhexina y el dicloruro de N-(naftil-(1)-etilendiamino, que tiene un máximo de absorción a 490 nm.

- USO TERAPÉUTICO ⁽⁷⁾

Expectorante mucolítico empleado como coadyuvante en el tratamiento de infecciones agudas y crónicas de las vías respiratorias como traqueobronquitis, bronquitis, neumonías crónico-inflamatorias, incluyendo los procesos broncopulmonares obstructivos de las vías aéreas con tos o secreción bronquial viscosa o adherente.

- FARMACODINAMIA ⁽⁷⁾

Ejerce acción mucolítica dado que fragmenta las fibras de mucopolisacáridos ácidos de la secreción viscosa y adherente del tracto respiratorio.

- FARMACOCINÉTICA ⁽⁷⁾

ABSORCIÓN

Después de ser administrada por vía oral, la Bromhexina es absorbida a través del tracto gastrointestinal y alcanza la concentración plasmática máxima al cabo de una hora.

DISTRIBUCIÓN

Tiene alta fijación a las proteínas plasmáticas (95 – 99%) y presenta un alto volumen de distribución, principalmente a nivel pulmonar.

BIOTRANSFORMACIÓN

A nivel de hígado sufre una biotransformación compleja por hidroxilación, desmetilación y ciclización, es decir que experimenta cinética de primer paso de un 75 a 80%. En plasma se han detectado por lo menos diez diferentes metabolitos entre los que se incluye el ambroxol, que es farmacológicamente activo.

ELIMINACIÓN

La mayor parte de la dosis administrada se elimina por vía renal en forma de metabolitos, en tanto que escasas cantidades (< al 10%) lo hacen en forma inalterada, aproximadamente un 4% es eliminado a través de las heces.

- TOXICIDAD

Fármaco poco tóxico. Pueden ocurrir ocasionalmente efectos gastrointestinales como anorexia, náuseas, vómito, gastritis y elevar en suero los valores de aminotransferasas.

- FORMAS FARMACÉUTICAS

Cápsulas de 500mg de Ampicilina Trihidratada /8mg de Clorhidrato de Bromhexina

Suspensión de 250mg de Ampicilina Trihidratada /8 mg de Clorhidrato de Bromhexina

Suspensión de 500mg de Ampicilina Trihidratada /8 mg de Clorhidrato de Bromhexina

Las formas farmacéuticas en las que se cuantificará Clorhidrato de Bromhexina tienen también como principio activo Ampicilina trihidratada, la cual se cuantifica por medio microbiológico, por lo que no será de interés en este trabajo.

Los conservadores que se desea identificar en las suspensiones son benzoato de sodio, metil-4-hidroxibenzoato y propil-4-hidroxibenzoato y se utilizan como preservantes de amplio espectro para prevenir el crecimiento de microorganismos dañinos, especialmente hongos y levaduras.

1.2.- Cromatografía

El botánico ruso M. S. Tswett empleó por primera vez en 1906 el término "cromatografía" (del griego *Chroma* y *graphein* que significan respectivamente "color" y "escribir"), al usar columnas de adsorción de líquidos para separar pigmentos vegetales (clorofilas) que se separaban en distintas bandas a lo largo de la columna ⁽⁸⁾.

El término cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de separación de compuestos que se encuentran en una mezcla, en las cuales entran en contacto dos fases mutuamente inmiscibles, siendo una de ellas estacionaria y la otra móvil. La muestra que se desea separar se pone en contacto con la fase móvil, la cual se desplaza a través de una columna que contiene la fase estacionaria y se producen una serie de particiones repetitivas entre ambas fases. Las interacciones se basan en las diferencias de propiedades físicas y químicas de los componentes de la muestra; estas diferencias determinan la velocidad de migración de los componentes individuales de la muestra bajo la influencia de una fase móvil. Los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado es el primero en salir y el que se retiene más fuertemente es el último ⁽⁹⁾.

En 1941 Martin y Synge desarrollaron la teoría de la cromatografía moderna y usaron matemáticas para describir el proceso de separación.

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según como esté dispuesta la fase estacionaria en ⁽⁸⁾:

Tabla 1.- Clasificación de Cromatografía

Cromatografía plana: La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas de este tipo son:		
Cromatografía en capa fina		
Cromatografía en papel		
Cromatografía en columna: La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen de la siguiente manera:		
Técnica	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido

1.2.1.- Cromatografía de líquidos de alta resolución (C. L. A. R.)

La técnica se denominó en un principio como Cromatografía de líquidos de Alta Presión debido a que con la aparición de partículas de fase estacionaria más pequeñas, era necesaria una alta presión para impulsar la fase móvil a través del sistema.

En cuanto a los mecanismos de retención la cromatografía de líquidos se puede clasificar en:

- 1) Cromatografía de adsorción: La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es un sólido que funciona como adsorbente del analito de manera reversible (adsorción-desorción) y se basa en la competencia entre las moléculas de soluto y de la fase móvil por ocupar los sitios activos de la fase estacionaria ^(11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 2) Cromatografía de partición: Ambas fases son líquidas, se basa en la distinta solubilidad que presenten las moléculas de la muestra en la fase móvil y en la estacionaria, de ahí que los compuestos más solubles en la fase estacionaria sean selectivamente retenidos por ella, en tanto que los menos solubles son transportados más rápidamente por la fase móvil ^(10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 3) Cromatografía de intercambio iónico: La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa con muestras iónicas o ionizables y se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina cambiadora de iones ^(10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 4) Cromatografía de exclusión: La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es un material con poros de dimensiones moleculares comprendidas entre ciertos límites con los que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. Si el material de la fase estacionaria es un gel reticulado se denomina filtración en gel y si es un polímero rígido se denomina permeación en gel ^(10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

La técnica de C.L.A.R., se puede clasificar también según la polaridad relativa de las dos fases en:

- 1) Fase normal: En este tipo de cromatografía se utilizan empaques polares (sílice) y fases móviles poco polares. Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que las poco polares ^(10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

- 2) Fase reversa o fase inversa: Involucra una fase estacionaria relativamente poco polar como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidas a los grupos silano del soporte y se utiliza por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares. Entre menos polar sea la muestra mayor será su retención (10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17)

Los primeros equipos de C. L. A. R., comenzaron a desarrollarse en 1960, aumentando su importancia en las décadas siguientes, hasta convertirse en la técnica cromatográfica más empleada.

Los componentes básicos de un sistema para C. L. A. R se pueden representar con el siguiente esquema:

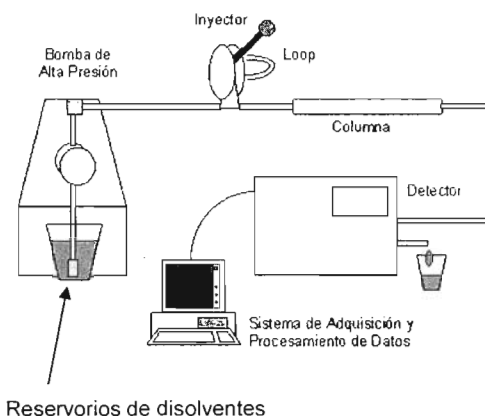


Figura 3.- Equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

- 1) Reservorios de fase móvil y disolventes: Son uno o más recipientes, generalmente de vidrio para el suministro de la fase móvil (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 2) Sistema de bombeo: Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y alcanza presiones hasta de 6000 psi. Se utiliza para ofrecer composiciones de fase móvil y flujos exactos. Debe proporcionar un flujo constante a través del sistema. La velocidad de flujo se expresa en mL/min. Cuando durante todo el proceso de separación se utiliza el mismo disolvente, se denomina elución isocrática, sin embargo se puede variar la composición de la fase móvil durante el tiempo de análisis a lo que se le llama elución en gradiente (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

- 3) Sistema de inyección de muestras: Con este dispositivo se logra una adecuada introducción de la muestra en el sistema y de manera reproducible. Existen inyectoros manuales y automáticos ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 4) Columna: Parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer, así como las dimensiones de la misma ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 5) Precolumna: Columna de menor tamaño que se coloca antes de la columna, diseñada para remover partículas que vienen del inyector antes de pasar por el guarda columna o columna ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 6) Guarda columna: filtro final para remover trazas y adsorber compuestos indeseables de la muestra ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 7) Termostato de columna. Es un compartimento de columna donde se regula la temperatura de la misma para asegurar condiciones cromatográficas estables.
- 8) Detector: Mide alguna propiedad del soluto o del disolvente. Los detectores basados en una propiedad del soluto responden a una propiedad física o fisicoquímica del soluto y que generalmente no la presenta la fase móvil y pueden ser:
 - a) Detector de U. V.: La cuantificación es posible cuando se utiliza este detector, debido a la relación lineal entre la absorbancia y la concentración del analito (esta relación se conoce como ley de Beer) ^(11,13, 14, 16, 18).
 - b) Detector de fluorescencia: Este es un detector selectivo que mide la luz de emisión de una muestra, ya que existen compuestos capaces de absorber radiación U.V. y subsecuentemente emitir radiación a una larga longitud de onda ^(11,13, 14, 16, 18).
 - c) Detector electroquímico: Mide alguna característica voltamperométrica (conductividad eléctrica, fuerzas coulombicas, reacciones redox) del soluto en una fase móvil polar, mediante electrodos ^(11,13, 14, 16, 18).

Los detectores basados en una propiedad del disolvente comparan el cambio global de alguna propiedad física de la fase móvil con y sin soluto eluido y pueden ser:

- d) Detector de índice de refracción: Mide diferencias de los índices de refracción del disolvente puro y la solución de prueba ^(11,13, 14, 16, 18).

- e) Detector de conductividad: Mide la conductividad del eluyente que pasa a través del detector ^(11,13, 14, 16, 18).

La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar.

- 9) Sistema de adquisición y procesamiento de datos: Es un sistema de registro de la respuesta del detector ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Un cromatograma es la representación gráfica de la respuesta captada por el detector en función del tiempo e indica la presencia de los componentes de la muestra como picos gaussianos.

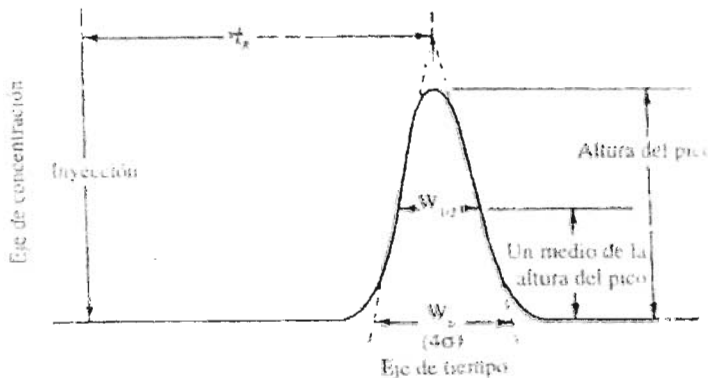


Figura 4.- Cromatograma obtenido por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Los parámetros teóricos que caracterizan las separaciones cromatográficas son:

- 1) Tiempo muerto (T_0): Tiempo en el cual eluye un componente de la muestra que no es retenido por la fase estacionaria ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 2) Tiempo de retención (T_r): Tiempo que transcurre desde que la muestra se introduce al sistema hasta el momento en el que se obtiene el punto máximo del pico, este valor es característico para cada compuesto en la misma columna bajo las mismas condiciones de trabajo ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

- 3) Factor de capacidad: Refleja la \square óvil \square cción de las moléculas con las fases estacionaria y móvil. Es una medida de la retención de los componentes de la muestra con respecto a un compuesto que no es retenido ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

$$K' = \frac{Tr_1 - t_0}{t_0}$$

Donde:

tr1 = Tiempo de retención del compuesto 1

t0 = Tiempo muerto

- 4) Selectividad: Describe la capacidad del sistema cromatográfico para distinguir entre 2 o más compuestos y se calcula matemáticamente como la relación de los factores de capacidad. Se puede modificar cambiando la composición de la fase móvil y/o la estacionaria ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

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

Donde:

K'1 = Factor de capacidad del soluto 1

K'2 = Factor de capacidad del soluto 2

- 5) Eficiencia de columna: Medida matemática del ensanchamiento de los picos a medida que pasan los componentes de la muestra a través de la columna. Se mide por los platos teóricos ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).
- 6) Platos teóricos (N): Equilibrio de distribución de los componentes de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil, es decir que son etapas de partición o distribución que sufren las moléculas de los compuestos durante su recorrido a lo largo de la columna ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

$$N = \frac{16 \cdot Tr^2}{W_b} \quad \text{ó} \quad N = 5.545 \left(Tr / W_{1/2} \right)^2$$

Donde:

Tr = tiempo de retención del soluto

Wb = Ancho del pico medido desde la línea base.

W_{1/2} = Ancho del pico a la mitad de la altura

- 7) Resolución: Es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos compuestos y es definido como la distancia que hay entre el centro de los picos dividida entre el promedio del ancho de los mismos. Entre mayor sea este valor la separación será mayor ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

$$R = \frac{2 (Tr_2 - Tr_1)}{W_2 + W_1}$$

Donde:

Tr_1 y tr_2 = tiempos de retención de cada soluto

W_1 y W_2 = ancho de picos

- 8) Simetría: Idealmente los picos cromatográficos deberían ser gaussianos o simétricos, sin embargo debido a algunos factores los picos presentan colas. Para medir matemáticamente el grado de formación de colas, se puede aplicar la ecuación de asimetría ^(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

$$\text{Asimetría} = b/a$$

Donde:

a = Distancia del centro del pico hacia el principio del mismo sobre la línea base

b = Distancia del centro del pico hacia el final del mismo sobre la línea base

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (C.L.A.R.) actualmente es una de las técnicas más ampliamente usadas por su gran diversidad de aplicaciones como las que se mencionan a continuación ⁽¹⁰⁾:

- En investigación química y bioquímica para:
 - Analizar mezclas complejas
 - Purificar compuestos químicos
 - Aislar componentes de productos naturales
- Como control de Calidad para:
 - Asegurar la pureza de materias primas
 - Como prueba de control y mejoramiento de procesos
 - Cuantificar compuestos en producto terminado y asegurar que se cumple con especificaciones

- Como control ambiental para:
 - Analizar contaminantes en aire y agua
 - Monitorear niveles de pesticidas en el ambiente
- En agencias regulatorias federales y estatales para:
 - Identificar narcóticos prohibidos
 - Para la comercialización de productos alimenticios y farmacéuticos.

1.3.- Método analítico

Se conoce como método analítico a la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para realizar un análisis de un componente específico de una muestra ⁽¹²⁾.

El procedimiento analítico por el que una muestra es procesada, se puede dividir en 4 subprocesos como se esquematiza en la figura No. 5.

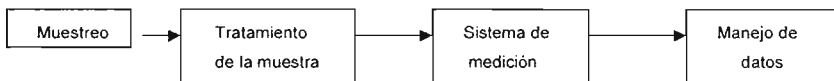


Figura 5.- Estructura de un procedimiento analítico

1.4.- Desarrollo del método de separación

El desarrollo de un método analítico se puede realizar empleando una herramienta estadística conocida como diseño de experimentos. Un diseño de experimentos involucra una serie de pruebas en las que se inducen cambios deliberados en algunos factores de algún subproceso del método analítico para observar e identificar el efecto de cada factor sobre una respuesta determinada ⁽¹⁹⁾.

Para poder llevar a cabo el desarrollo de un método empleando esta herramienta es necesario determinar una o varias respuestas a medir como tiempo de retención, área, simetría entre otros, en el caso de métodos cromatográficos; identificar los factores que podrían afectar dichas respuestas, elegir los factores a estudiar y los niveles de trabajo (uno bajo y uno alto).

El diseño de experimentos factorial es en el que cada nivel de un factor se corre en combinación a todos los niveles de los otros factores como se muestra a continuación:

Factor A	Factor B
-	-
+	-
-	+
+	+

Niveles: (-) valor mínimo del factor
(+) valor máximo del factor

Este tipo de diseño permite al analista investigar los efectos individuales o principales de cada factor y determinar si existe alguna interacción entre los factores.

Una vez identificados los factores, determinadas las respuestas a evaluar y seleccionados los factores y niveles a estudiar, se ejecuta el diseño, se realiza un análisis gráfico y numérico con los resultados obtenidos, se calcula la ecuación del modelo y se buscan las condiciones de trabajo para obtener las respuestas deseadas.

Una vez desarrollado el método analítico se debe asegurar que éste sea confiable para los fines deseados, para lo cual se lleva a cabo la validación del mismo.

1.5.- Validación de métodos analíticos ^(20, 21,22,23,24)

La validación de un método analítico es un proceso por el cual se obtiene evidencia experimental documentada, por estudios de laboratorio de que un método analítico es confiable para las aplicaciones analíticas deseadas.

Este proceso exige el tratamiento estadístico para el manejo y análisis de los datos permitiendo juicios con criterio que llevan a una correcta evaluación del método.

La validación de un método se lleva a cabo mediante la evaluación de ciertos parámetros como especificidad y/o selectividad, linealidad, exactitud, precisión evaluada como repetibilidad y precisión intermedia y límites de detección y cuantificación.

Los parámetros requeridos para la validación de un método analítico dependen de la aplicación del mismo, por lo que es importante conocer la clasificación según la USP de los métodos analíticos de acuerdo a su aplicación⁽²³⁾.

Categoría I.- Métodos empleados para la cuantificación de principios activos y materias primas incluyendo conservadores en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II.- Métodos para la determinación de impurezas en materias primas o producto terminado. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y cualitativos.

Categoría III.- Métodos para la determinación de características del comportamiento del producto como disolución o liberación del activo.

Categoría IV.- Pruebas de identificación.

En la siguiente tabla se muestran los elementos requeridos para la validación de cada tipo de método⁽²³⁾.

Tabla 2.- Tabla de elementos requeridos para la validación

PÁRAMETRO	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III	CATEGORÍA IV
	CONTENIDO/ POTENCIA/ VALORACIÓN	CONTENIDO/ VALORACIÓN	PRUEBAS LÍMITE	CONTENIDO	IDENTIFICACIÓN
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Tolerancia	SI	SI	SI	*	NO
Límite de detección	NO	SI	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Rango	SI	SI	*	*	NO

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

1.5.1.- Adecuabilidad del sistema ^(20, 21, 22, 23)

Esta prueba se realiza antes de cada análisis para verificar que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia entre otros) opera con base a criterios preestablecidos que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

1.5.2.- Selectividad ^(20, 21, 22, 23)

Este parámetro nos indica si el método es capaz de medir al compuesto de interés en presencia de los componentes (excipientes) que se supone están presentes dentro de la matriz de la muestra.

1.5.3.- Linealidad ^(20, 21, 22, 23)

Es la relación matemática existente entre la concentración de analito a evaluar con respecto a una respuesta observada. Esta respuesta puede ser la absorción de la luz U.V., el área de una señal cromatográfica entre otras. Es decir que la linealidad es la capacidad del método de asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo determinado.

1.5.4.- Exactitud ^(20, 21, 22, 23)

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente empleando el método a la muestra, y un valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se le ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés.

1.5.5.- Precisión ^(20, 21, 22, 23)

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia. Se evalúa como repetibilidad y precisión intermedia.

1.5.5.1.- Repetibilidad

Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones realizadas por un solo analista usando los mismos instrumentos y método en dos días diferentes.

1.5.5.2.- Precisión intermedia

Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

1.5.6.- Estabilidad ^(20, 21, 22, 23)

Es la propiedad de una muestra y una referencia, preparadas para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado, bajo condiciones específicas. Se determina evaluando la diferencia absoluta del porcentaje de recuperación obtenido bajo cada condición de almacenaje con respecto al valor inicial.

1.5.7.- Tolerancia ^(20, 21, 22, 23)

Es la medida de la capacidad del método de permanecer inalterable ante pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros y darnos una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. Puede describirse también como la habilidad de reproducir un método bajo variaciones normales de trabajo y que los cambios no afecten drásticamente a la respuesta esperada.

1.5.8.- Límite de detección ^(20, 21, 22, 23)

Es la mínima concentración de un analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. Este parámetro es informativo acerca de qué tan sensible es el método.

1.5.9.- Límite de cuantificación ^(20, 21, 22, 23)

Es la mínima concentración de un analito en una muestra la cual puede ser determinada de manera fidedigna y que cumple con los criterios de precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones de operación establecidas.

2.- Parte experimental

2.1.- Recursos materiales

2.1.1.- Estándares

- Clorhidrato de Bromhexina Lote 0005/206387.
- Benzoato de Sodio lote 004/101429.
- Metil-4-hidroxibenzoato Lote 0005/191689.
- Propil-4-hidroxibenzoato Lote 0005/191689.
- Ampicilina Lote 042K104S.

2.1.2.- Reactivos

- Agua desionizada
- Metanol HPLC TecnoLab Lote 02/18/04 4LGR13, EMD Lote 43308345 y 43342356.
- Acetonitrilo HPLC TecnoLab Lote GR310/30/034L y 04/21/04 4LGR16 y EMD Lote 44026405.
- Trietilamina (TEA) Merck Lote 530379016.
- Ácido o-fosfórico al 85% Baker Lote 0260-59.
- Ácido clorhídrico Baker Lote 983302.
- Hidróxido de sodio J.T. Baker Lote X29054.
- Peróxido de hidrógeno VWR Lote K31856110320.

2.1.3.- Equipos

- Balanza Analítica Sartorius A210 P No. de Serie 40040065.
- Potenciómetro Termo Orion modelo 410 S/N 058090.
- Milli-Q-Water System Millipore.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Agilent modelo 1100.
 - Desgasificador modelo GI379A No. de serie JP13214181.
 - Bomba cuaternaria modelo GI11A No. de serie DE40926152.
 - Inyector modelo GI313A No. de serie DE33224747.
 - Termostato de columna modelo GI316A No. de serie DE91611728.
 - Detector de longitud de onda variable modelo GI314A No. de serie JP33323201.

2.1.4.- Columnas cromatográficas

- Nova Pak c18, 3.9 * 150 mm, 4 μ s.
- LichroCART Superspher 100 RP-18, 4 * 125 mm, 5 μ s.

2.1.5.- Material de vidrio

- Matraces volumétricos de 10, 25, 50 y 100 mL.
- Matraces volumétricos de 1 y 2 L.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y 7 mL.
- Pipeta graduada de 10 mL.
- Matraces Kitasato de 1 y 2 L.
- Agitador magnético.
- Agitador vórtex Thermolyne.
- Membranas de 0.45 μ s.
- Acrodiscos de filtración de 0.45 μ s, de nylon.
- Jeringas de 5 mL.
- Vasos de precipitados de 400 mL, 1 y 2 L.

2.2.- Preparación de soluciones

- Hidróxido de sodio 1 N:

Pesar 1g de hidróxido de sodio y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y llevar a volumen con agua.

- Ácido Clorhídrico 1 N:

Tomé 2.0 mL de ácido clorhídrico concentrado, lo adicioné a un matraz volumétrico de 25mL con 10 mL de agua y lo llevé a volumen con agua.

- TEA 0.015 M pH 3.0, pH 3.9 y pH 5.0:

Filtré agua desionizada por membrana de 0.22 micras. Adicioné 1 L de agua a un matraz volumétrico de 2 L, agregué 4.1 mL de TEA y llevé a volumen con agua desionizada. Ajusté al pH deseado con ácido fosfórico al 85% y si era necesario con NaOH 1N.

- **Fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (43:57):**

Mezclar 570 mL de solución de trietilamina 0.015 M pH 3.9 con 430 mL de Acetonitrilo HPLC. Filtrar por membrana de 0.45 micras. Desgasificar 15 minutos en baño de ultrasonido.

- **Fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.0 (43:57):**

Mezclar 570 mL de solución de trietilamina 0.015 M pH 3.0 con 430 mL de Acetonitrilo HPLC. Filtrar por membrana de 0.45 micras. Desgasificar 15 minutos en baño de ultrasonido.

- **Fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 5.0 (43:57):**

Mezclar 570 mL de solución de trietilamina 0.015 M pH 5.0 con 430 mL de Acetonitrilo HPLC. Filtrar por membrana de 0.45 micras. Desgasificar 15 minutos en baño de ultrasonido.

- **Fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.0 (39:61):**

Mezclar 610 mL de solución de trietilamina 0.015 M pH 3.0 con 390 mL de Acetonitrilo HPLC. Filtrar por membrana de 0.45 micras. Desgasificar 15 minutos en baño de ultrasonido.

- **Fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 5.0 (39:61):**

Mezclar 610 mL de solución de trietilamina 0.015 M pH 5.0 con 390 mL de Acetonitrilo HPLC. Filtrar por membrana de 0.45 micras. Desgasificar 15 minutos en baño de ultrasonido.

- **Fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (63:37):**

Mezclar 630 mL de solución de trietilamina 0.015 M pH 3.9 con 370 mL de Acetonitrilo HPLC. Filtrar por membrana de 0.45 micras. Desgasificar 15 minutos en baño de ultrasonido.

- **Solución estándar de Clorhidrato de Bromhexina (0.026 mg / mL) 100%:**

Pesar con exactitud aproximadamente 26 mg de Clorhidrato de Bromhexina sustancia de referencia, 32 mg de Benzoato de sodio, 16 mg de metil-4-hidroxibenzoato y 3.5 mg de propil-4-hidroxibenzoato, disolver y llevar a volumen de 100 mL con metanol HPLC.

Tomar 5.0 mL de la solución anterior y diluir con fase móvil hasta 50 mL.

- **Solución de Clorhidrato de Bromhexina:**

Pesar con exactitud aproximadamente 26 mg de Clorhidrato de Bromhexina sustancia de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con Metanol HPLC. Tomar 5.0 mL de la solución anterior y diluir con la fase móvil correspondiente hasta 50 mL.

- **Solución de benzoato de sodio:**

Pesar aproximadamente con exactitud 20 mg de Benzoato de sodio sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y llevar a volumen con metanol HPLC. Tomar una alícuota de 2.0 mL de la solución recién preparada y llevar a volumen de 50 mL con la fase móvil correspondiente.

- **Solución de Metil-4-hidroxibenzoato:**

Pesar con exactitud aproximadamente 10 mg de Metil-4-hidroxibenzoato, transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y llevar a volumen con metanol HPLC. Tomar 2.0 mL de la solución preparada y llevar a volumen de 50 mL con la fase móvil correspondiente.

- **Solución de Propil-4-hidroxibenzoato:**

Pesar con exactitud 3.5 mg de Propil-4-hidroxibenzoato, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con metanol HPLC. Tomar una alícuota de 5.0 mL de la solución recién preparada y llevar a volumen de 50 mL con la fase móvil correspondiente.

- **Solución de Ampicilina:**

Pesar 93 mg de estándar de ampicilina trihidratada, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 5 mL de metanol y aproximadamente 20 mL de la fase móvil correspondiente. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con la fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras.

- **Solución de placebo de cápsulas:**

Mezclar 692 mg de placebo de cápsulas con 11.548 g de estándar de ampicilina trihidratada (equivalente a 20 cápsulas).

Pesar 100 mg de la mezcla preparada, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 5 mL de metanol y aproximadamente 20 mL de la fase móvil correspondiente. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con la fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras.

- **Solución de placebo de suspensiones de 500 mg/8 mg:**

Mezclar 20.4 g de placebo de suspensión de 500 mg/8 mg con 3.6 g de estándar de ampicilina trihidratada (equivalente a un frasco).

Pesar 650 mg de la mezcla preparada anteriormente, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 5 mL de metanol y aproximadamente 20 mL de la fase móvil correspondiente. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con la fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras.

- **Curva de calibración 1 (para la prueba de linealidad del sistema):**

+ Solución stock de estándar de Clorhidrato de Bromhexina (0.26 mg/mL):

Pesar con exactitud aproximadamente 26 mg de Clorhidrato de Bromhexina sustancia de referencia, 32 mg de Benzoato de sodio, 16 mg de Metil-4-hidrobenzoato y 3.5 mg de propil-4-hidrobenzoato, disolver y llevar a volumen de 100 mL con metanol HPLC.

Tabla 3.- Curva de calibración para linealidad del sistema

Nivel	Volumen (mL) de Solución stock	Aforo (mL)	Concentración de Clorhidrato de Bromhexina (mg/mL)
50	5.0 (solución al 100%)	10	0.0130
80	2.0	25	0.0208
100	5.0	50	0.0260
120	3.0	25	0.0312
160	4.0	25	0.0416

- **Curva de calibración 2 (para la prueba de Exactitud y Linealidad del método):**

+ Solución stock de estándar de Clorhidrato de Bromhexina (0.26 mg/mL):

Pesar 26.1 mg de estándar de Clorhidrato de Bromhexina, disolver y llevar a volumen de 100 mL con Metanol HPLC.

Tabla 4.- Curva de calibración para exactitud y linealidad del método

Nivel	Volumen (mL) de Solución stock	Aforo (mL)	Concentración de Clorhidrato de Bromhexina (mg/mL)
60	3.0	50	0.0156
100	5.0	50	0.0260
40	7.0	50	0.0364

Para cápsulas, pesar 100 mg de placebo, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y añadir las alícuotas mencionadas en la tabla 4, según el nivel de concentración deseado, agregar aproximadamente 20 mL de la fase móvil correspondiente. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con la fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras.

Para las suspensiones pesar 650 mg de placebo respectivo a cada presentación transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y añadir las alícuotas mencionadas en la tabla 4, según el nivel de concentración deseado, agregar aproximadamente 20 mL de la fase móvil correspondiente. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con la fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras.

- **Curva de calibración 3 (para la prueba de Límite de detección y cuantificación):**

+ Solución stock de Clorhidrato de Bromhexina (0.26 mg/mL):

Pesar con exactitud aproximadamente 26 mg de Clorhidrato de Bromhexina sustancia de referencia, 32 mg de Benzoato de sodio, 16 mg de Metil-4-hidroxibenzoato y 3.5 mg de propil-4-hidroxibenzoato, disolver y llevar a volumen de 100 mL con metanol HPLC. Tomar 5.0 mL de la solución anterior y diluir con la fase móvil correspondiente hasta 50 mL.

Tabla 5.- Curva de calibración para límite de detección y de cuantificación

Nivel	Volumen (mL) de Solución stock	Aforo (mL)	Concentración de Clorhidrato de Bromhexina (µg/mL)
1	1.0	100	0.26
2	1.0	50	0.52
4	1.0	25	1.04
6	3.0	50	1.56
8	2.0	25	2.08
10	1.0	10	2.6

- **Solución de Muestra de cápsulas 500 mg/8 mg:**

Pesar 20 cápsulas, mezclar y moler el contenido de las cápsulas.

Pesar con exactitud aproximadamente 100 mg de la mezcla preparada por el método de cuarteo. Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 5 mL de Metanol HPLC y aprox. 20 mL de la fase móvil correspondiente. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con la fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras.

- **Solución de Muestra de suspensión de 250 mg/8 mg:**

Vaciar el contenido de un frasco a un mortero, moler y mezclar. Pesar con exactitud aproximadamente 650 mg. Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 5 mL de Metanol HPLC y aprox. 20 mL de la fase móvil correspondiente. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con la fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras

- **Solución de Muestra de suspensión de 500 mg/8 mg:**

Vaciar el contenido de un frasco a un mortero, moler y mezclar. Pesar con exactitud aproximadamente 650 mg del contenido de un frasco de producto. Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 5 mL de Metanol HPLC y aprox. 20 mL de fase móvil. Sonicar en baño ultrasónico 15 minutos, dejar enfriar y llevar a volumen con fase móvil correspondiente. Agitar 1 minuto en vórtex. Filtrar con acrodiscos de nylon de 0.45 micras.

2.3.- Desarrollo del método analítico

- 1) Reproducir el método analítico reportado en la literatura ^(6,4) y observar las señales cromatográficas tanto del Clorhidrato de Bromhexina como de los conservadores.

Método analítico:

Subproceso Muestreo ⁽⁶⁾:

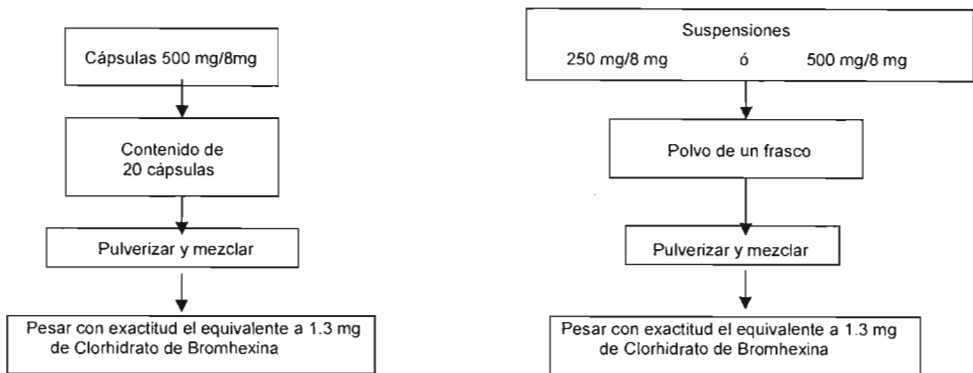


Figura 6.- Proceso de muestreo

Subproceso Tratamiento de la muestra ⁽⁴⁾:

Para los tres productos farmacéuticos:

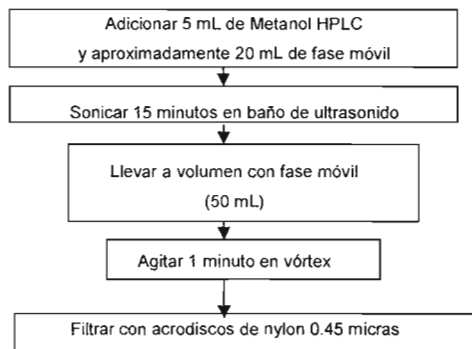


Figura 7.- Proceso de tratamiento de la muestra

Subproceso Sistema de medición:

Este proceso se obtuvo de la literatura ⁽⁴⁾.

Equipo: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Detector: U.V./Vis

Columna: Nova Pak c18, 3.9 * 150 mm, 4 µs.

Fase móvil: Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (43:57)

Flujo: 1.0 mL / min

Volumen de inyección: 20.0 µL

Longitud de onda: 245 nm

Subproceso Manejo de datos:

Procesar los cromatogramas que se obtengan mediante HP ChemStations integrando las señales cromatográficas de base a base. Realizar análisis numéricos y gráficos en Excel y Statgraphics.

- 2) Determinar el subproceso a evaluar.
- 3) Seleccionar las respuestas a evaluar.
- 4) Identificar los factores de dicho subproceso que pueden afectar las respuestas determinadas.
- 5) Seleccionar los factores y niveles a evaluar.
- 6) Ejecutar cada experimento.
- 7) Realizar análisis gráfico y numérico con los datos obtenidos.
- 8) Predecir las condiciones para obtener las respuestas deseadas.
- 9) Confirmar experimentalmente que con las condiciones predichas se obtengan las respuestas deseadas.

2.4.- Protocolo de validación

Para asegurar que el método propuesto es confiable para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en cápsulas y suspensiones e identificar algunos conservadores en las suspensiones es necesario evaluar tanto la validez del sistema como la del método, mediante las siguientes pruebas de laboratorio.

2.4.1.- Adecuabilidad del sistema

Preparar 2 soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% (ver en la sección de preparación de soluciones página 20).

Inyectar por quintuplicado una de las soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% e inyectar una sola vez la otra solución de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100%.

Criterio de aceptación: C.V. < 2%, $k' > 2$, $R_s > 2$, $T = 0.5 - 2.0$,
Tr aproximadamente constante.

Donde:

C.V. = Coeficiente de variación

R_s = Resolución

k' = Factor de capacidad

T = Coleo

Tr = Tiempo de retención

Nota: Las pruebas siguientes se deberán realizar con la preparación de 2 soluciones de estándares de Clorhidrato de Bromhexina al 100% para confirmar la adecuabilidad del sistema.

2.4.2.- Selectividad

Debido a que no se cuenta con productos de degradación, realizar esta prueba de la siguiente manera:

Analizar soluciones de:

- 1) Estándar de Clorhidrato de Bromhexina, Benzoato de sodio, Metil-4-hidroxibenzoato y Propil-4-hidroxibenzoato*.
- 2) Ampicilina*.
- 3) Placebo de cápsulas y suspensiones cargados con ampicilina*.
- 4) Muestras de cápsulas y suspensiones*.

* La preparación de cada solución se describe en la sección de preparación de soluciones páginas 21 y 22.

Someter cada solución a condiciones de estrés de la siguiente manera:

- a. *Calentamiento*: Preparar 2 soluciones de estándares de Clorhidrato de Bromhexina, Benzoato de sodio, Metil-4-hidroxi-benzoato, Propil-4-hidroxi-benzoato, ampicilina, de placebo de cápsulas y de suspensión de 500mg/8mg como se menciona en la parte de preparación de soluciones páginas 21 y 22. Transferir cada solución a un vaso de precipitados, calentar 1h en parrilla. Analizar a los tiempos 0, 8 y 15 días.
- b. *Hidrólisis ácida*: Preparar 2 soluciones de estándares de Clorhidrato de Bromhexina, Benzoato de sodio, Metil-4-hidroxi-benzoato, Propil-4-hidroxi-benzoato, ampicilina, de placebo de cápsulas y de suspensión de 500mg/8mg como se menciona en la parte de preparación de soluciones páginas 21 y 22, agregando antes de aforar 1 mL de ácido Clorhídrico 1N. Analizar a los tiempos 0, 8 y 15 días.
- c. *Hidrólisis básica*: Preparar 2 soluciones de estándares de Clorhidrato de Bromhexina, Benzoato de sodio, Metil-4-hidroxi-benzoato, Propil-4-hidroxi-benzoato, ampicilina, de placebo de cápsulas y de suspensión de 500mg/8mg como se menciona en la parte de preparación de soluciones páginas 21 y 22, agregando antes de aforar 1 mL de Hidróxido de sodio 1N. Analizar a los tiempos 0, 8 y 15 días.
- d. *Oxidación*: Preparar 2 soluciones de estándares de Clorhidrato de Bromhexina, Benzoato de sodio, Metil-4-hidroxi-benzoato, Propil-4-hidroxi-benzoato, ampicilina, de placebo de cápsulas y de suspensión de 500mg/8mg como se menciona en la parte de preparación de soluciones páginas 21 y 22, agregando antes de aforar 1 mL de H₂O₂. Analizar a los tiempos 0, 8 y 15 días.

Criterio de aceptación: Los productos de degradación no deben interferir con la señal del compuesto de interés.

2.4.3.- Linealidad del sistema

Preparar 2 curvas de calibración utilizando 5 niveles diferentes de concentración de la solución estándar de Clorhidrato de Bromhexina, en un rango del 50 al 160% (0.013 mg/mL a 0.0416 mg/mL), a partir de 2 soluciones patrón (pesadas independientes). Inyectar cada solución por duplicado. Ver la preparación de cada solución en la página 22.

Determinar la relación que existe entre la concentración de Clorhidrato de Bromhexina (x) y su respuesta, expresada como área bajo la curva (y).

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98 y el coeficiente de variación de la respuesta debe ser menor o igual a 2.0%

2.4.4.- Precisión del sistema

Injectar 6 veces una solución estándar de Clorhidrato de Bromhexina a una concentración al 100% (ver la preparación de la solución en la página 20).

Calcular el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la respuesta de las 6 inyecciones, para la señal de Clorhidrato de Bromhexina.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación de la respuesta del compuesto de interés debe ser menor o igual a 1.5%.

2.4.5.- Linealidad del método

Preparar 3 curvas con 3 niveles de concentración de Clorhidrato de Bromhexina (60, 100 y 140%) adicionado a los placebos de cada producto y 3 réplicas por cada nivel. Ver la preparación de estas soluciones en las páginas 22 y 23.

Determinar la relación que existe entre los mg/mL adicionados de Clorhidrato de Bromhexina a los placebos de cada producto (x) y los mg/mL recuperados (y).

Con los datos obtenidos calcular la ordenada al origen, pendiente, coeficiente de determinación, ecuación de la recta, porcentaje recuperado, promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente.

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente de uno.

2.4.6 .- Exactitud del método

Preparar 3 curvas con 3 niveles de concentración de Clorhidrato de Bromhexina (60, 100 y 140%) adicionado a los placebos de cada producto y 3 réplicas por cada nivel. Ver la preparación de estas soluciones en las páginas 22 y 23.

Calcular el porcentaje recuperado de Clorhidrato de Bromhexina, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: El promedio del porcentaje recuperado del compuesto de interés debe encontrarse entre el 98.0 y 102.0%.

2.4.7.- Precisión del método

2.4.7.1.- Repetibilidad

Determinar la respuesta de 6 soluciones de muestras de cada producto preparadas por un analista en dos días diferentes. Ver la preparación de estas soluciones en la página 24.

Calcular el porcentaje recuperado, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del porcentaje recuperado de las seis réplicas analizadas.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación del porcentaje recuperado debe ser menor o igual a 1.5%.

2.4.7.2.- Precisión intermedia

Evaluar al analizar por triplicado, de acuerdo con el método, una muestra homogénea de cada producto durante dos días, por dos analistas. Ver la preparación de estas soluciones en la página 24.

Con los datos obtenidos por día, por analista y globales, calcular el porcentaje recuperado, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación del porcentaje recuperado para cada día de análisis y por analista y global no debe ser mayor que 2.0%.

2.4.8.-Tolerancia

Procesar 2 soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100%* y 2 muestras de cada producto ** según el método propuesto y analizarlas bajo las condiciones indicadas en la siguiente tabla:

* Ver preparación en la pagina 20

** Ver preparación en la página 24

Tabla 6.- Condiciones para evaluar tolerancia

Condición	Polaridad de la fase móvil (% H ₂ O)	pH	Columna
1	60	3.7	Nova pak c18, 3.9 * 150 mm, 4 micras
2	66	4.1	LichroCART Superspher 100 RP-18, 4 * 125 mm, 5 micras

Probar cada condición por separado manteniendo constante todo lo demás. Ver cómo se modifica el tiempo de retención de la señal cromatográfica de Clorhidrato de Bromhexina y la resolución entre el benzoato de sodio y el metil-4-hidroxi benzoato, así como el porcentaje de recuperación de Clorhidrato de Bromhexina en cada producto.

2.4.9.- Estabilidad

2.4.9.1.- De fase móvil

Preparar la fase móvil correspondiente y analizar soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% (ver preparación en página 20) ese mismo día, almacenar la fase móvil durante 7 días bajo condiciones de refrigeración y temperatura ambiente y analizar soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% recién preparadas con dichas fases. Evaluar como se modifican ciertos parámetros cromatográficos.

2.4.9.2.- De soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100%

Analizar 2 soluciones de estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100% (ver preparación en página 20) y almacenarlas bajo las siguientes condiciones:

- a) Refrigeración
- b) Temperatura ambiente y luz
- c) Temperatura ambiente y oscuridad

Analizar diariamente inyectando cada solución por duplicado.

2.4.9.3.- De muestras

Analizar 2 muestras de cada producto (ver preparación en página 24) y almacenarlas bajo las siguientes condiciones:

- d) Refrigeración
- e) Temperatura ambiente y luz
- f) Temperatura ambiente y oscuridad

Analizar diariamente inyectando cada solución por duplicado.

Tanto para la estabilidad de muestras como de estándares, calcular el promedio del porcentaje de recobro del análisis inicial y de cada condición de almacenaje. Calcular la diferencia absoluta del promedio de cada condición de almacenaje con respecto del análisis inicial.

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de los promedios de porcentaje de recobro a cada condición de almacenaje con respecto al análisis inicial debe ser menor o igual a 2.0%.

Para la estabilidad de fase móvil, ver como se modifican los parámetros cromatográficos y ver si aparecen picos de productos de degradación de la fase móvil.

2.4.10.- Límite de detección (L.D.)

Debido a que no se cuenta con límites de impurezas de Clorhidrato de Bromhexina. Preparar 6 niveles de concentración en un rango del 1 al 10% (0.26 µg/mL a 2.6 µg/mL) de Clorhidrato de Bromhexina. Cada nivel debe prepararse por duplicado por dilución de una solución de referencia concentrada. Ver preparación de la curva en la página 23.

Reportar la relación concentración contra respuesta (área). Calcular el valor de la pendiente, ordenada al origen, desviación estándar de la regresión, coeficiente de determinación.

Calcular el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$L.D. = \frac{3.3 S_{x/y}}{b_1}$$

Donde:

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

b_1 = Pendiente

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98.

2.4.11.- Límite de cuantificación (L.C.)

Con los mismos datos obtenidos de la prueba de límite de detección, calcular el límite de cuantificación con la siguiente ecuación:

$$L.C. = \frac{10 S_{x/y}}{b_1}$$

Donde:

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

b_1 = Pendiente

Una vez que se determina el límite de cuantificación verificar su reproducibilidad preparando una solución con la concentración encontrada e inyectando la solución 6 veces.

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98. El coeficiente de variación de las áreas de las 6 inyecciones no debe ser mayor a 10%.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Desarrollo del método analítico

Los subprocesos de muestreo, tratamiento de la muestra y manejo de datos se mantuvieron constantes (ver páginas 25 y 26).

Reproducción del método bibliográfico

- Fase móvil Acetonitrilo : Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (43:57):

Tabla 7.- Datos al reproducir el proceso de medición bibliográfico

Compuesto	Tr (min)	Rs
Benzoato de sodio	1.751	---
Metil-4-hidroxibenzoato	2.060	2.48
Propil-4-hidroxibenzoato	4.407	15.09
Clorhidrato de Bromhexina	8.912	15.89

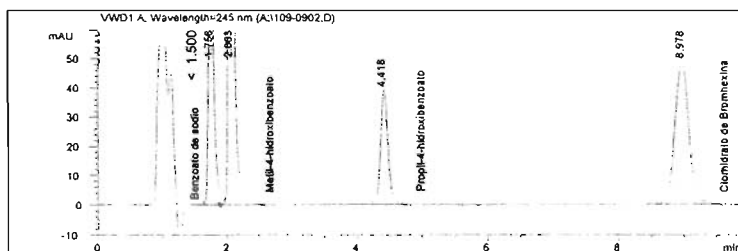


Figura 8.- Cromatograma al reproducir el proceso de medición bibliográfico

Al reproducir este sistema de medición se observa que las señales del Clorhidrato de Bromhexina y del Propil-4-hidroxibenzoato se resuelven bien, pero la resolución entre el benzoato de sodio y el metil-4-hidroxibenzoato es de 2.48 por lo que se decidió mejorar la separación de estos dos conservadores.

Diseño de experimentos

Respuestas a evaluar: Tiempo de retención del Clorhidrato de Bromhexina (min)

Simetría

Factores a estudiar: Polaridad de la fase móvil (% H₂O)

pH

Polaridad (% H ₂ O)	pH
-	-
+	-
-	+
+	+

Niveles: (-) 57%, pH 3.0

(+) 61%, pH 5.0

Cada experimento se corrió con una réplica.

- **Resultados del diseño:**

Tabla 8.- Resultados diseño experimental

Corrida	Bloque	Polaridad (%H ₂ O)	pH	Tr (min)	Simetría
1	1	57	3	3.918	0.53
2	1	61	3	5.829	0.43
3	1	61	5	55.426	1.49
4	1	57	5	43.18	1.64
5	2	57	3	3.845	0.55
6	2	61	3	5.041	0.46
7	2	61	5	56.787	1.46
8	2	57	5	43.567	1.58

l) Análisis gráfico para la respuesta de Tiempo de retención:

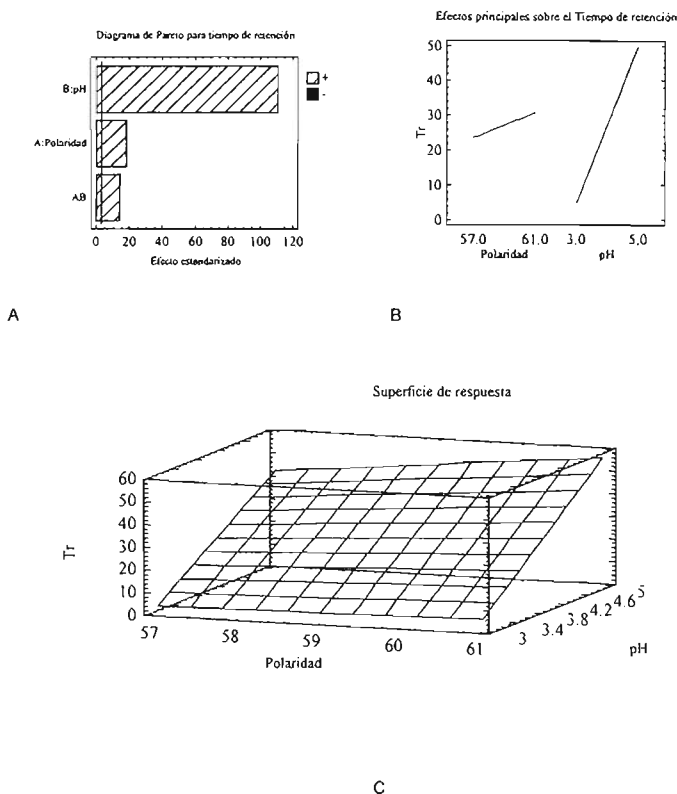


Figura 9. Gráficas: A) Diagrama de Pareto para Tr, B) Efectos principales de los factores, C) Superficie de respuesta

En el diagrama de Pareto (gráfica A de la figura 9) se puede observar que los dos factores y su interacción tienen un efecto significativo sobre la respuesta de tiempo de retención, debido a que las barras que representan a cada factor y su interacción están por arriba de la línea que representa el valor mínimo de efecto estandarizado que se requiere para que el efecto sea significativo sobre la respuesta.

En la gráfica B de la figura 9 se puede observar que al aumentar la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de retención y al aumentar el pH el tiempo de retención aumenta considerablemente, esto es debido a que el Clorhidrato de Bromhexina es un compuesto iónico el cual se ve afectado notablemente por el pH de la fase móvil.

En la gráfica C de la figura 9 se puede corroborar la información mencionada, de que al aumentar tanto la polaridad de la fase móvil como el pH, la respuesta aumenta.

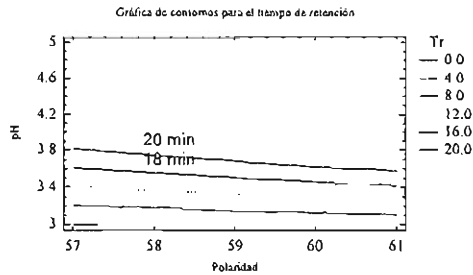


Figura 10.- Gráfica de contornos para el tiempo de retención

En la figura 10 se muestran las líneas de contorno para obtener respuesta de tiempo de retención entre los 4 y los 20 minutos. Esta gráfica nos servirá posteriormente para predecir las condiciones a las cuales se puede obtener un tiempo de retención deseado.

2) Análisis numérico para la respuesta de tiempo de retención:

Tabla 9.- Análisis de varianza para T_r

Fuente de variación	Totales	1	2	Efecto	Suma de cuadrados	Df	SCM	F calc.	F tab (0.05)
1	7.76	18.63	217.59	54.3983	5918.34	0	--	--	--
A: Polaridad	10.87	198.96	28.57	7.1433	102.05	1	102.05	310.62	7.71
B: pH	86.75	3.11	180.33	45.0818	4064.73	1	4064.73	12371.89	7.71
AB	112.21	25.47	22.36	5.5898	62.49	1	62.49	190.20	7.71
Error					1.31	4	0.33		
Total					4230.59	7			

En la tabla 9 se observa que los dos factores y su interacción tienen efecto significativo sobre la respuesta de tiempo de retención, ya que se observan valores de F calculadas mayores a las F de tablas a un nivel de confianza de 95%.

La ecuación que describe este modelo se obtiene mediante una transformación matemática y un ajuste por mínimos cuadrados para la respuesta de tiempo de retención*.

* Estos cálculos se realizaron con ayuda del programa de computación estadístico llamado STATGRAPHICS.

De donde se obtienen los coeficientes que se muestran en la siguiente tabla:

Fuente de variación	Coefficientes de regresión
1	161.468
A: Polaridad	-3.80394
B: pH	-59.9079
AB	1.39744

Quedando la ecuación del modelo de la siguiente manera:

$$Tr = 161.468 - 3.80394 * Polaridad - 59.9070 * pH + 1.39744 * Polaridad * pH$$

Mediante esta ecuación se puede establecer la relación existente entre los factores y la respuesta.

Otra respuesta importante que se quiso evaluar fue la de simetría:

3) Análisis gráfico para la respuesta de simetría:

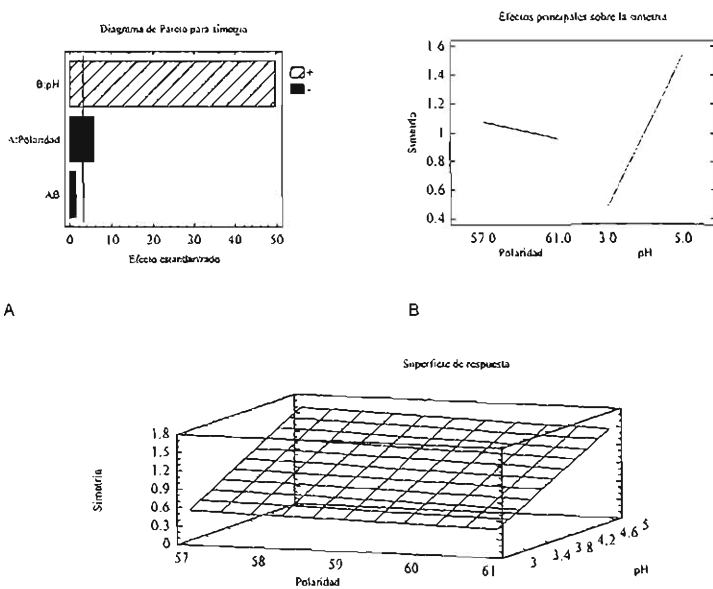


Figura 11.- Gráficas: A) Diagrama de Pareto para simetría B) Efectos principales de los factores, C) Superficie de respuesta

En la gráfica A de la figura 11 se puede observar que los factores tienen un efecto significativo sobre la respuesta de simetría, debido a que las barras están por arriba de la línea que indica el valor mínimo del efecto estandarizado para que el efecto sea significativo.

En la gráfica B de la figura 11 se puede observar que al aumentar la polaridad de la fase móvil la simetría disminuye y al aumentar el pH, la simetría aumenta, esto debido a que el tiempo de retención aumenta a pH de 5.0, por lo que el compuesto permanece más tiempo en la columna y se colea.

En la gráfica C de la figura 11 se puede corroborar que al aumentar la polaridad de la fase móvil, la simetría disminuye y que al aumentar el pH, la simetría aumenta.

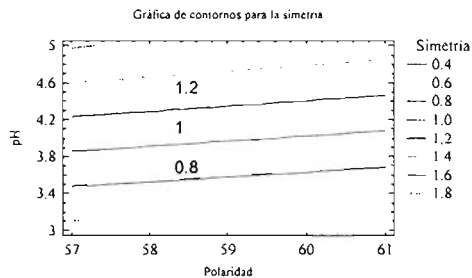
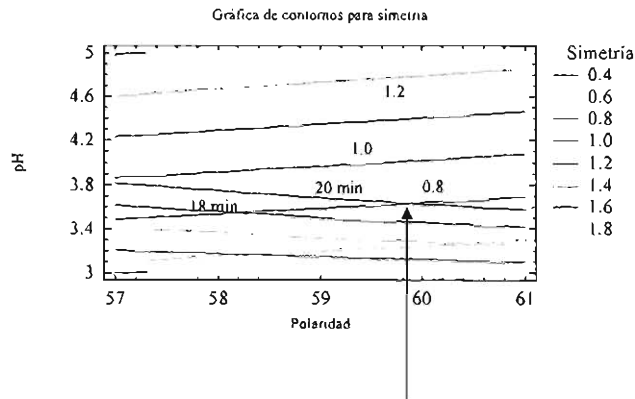


Figura 12.-Gráfica de contornos para la simetría

En la figura 12 se muestran las líneas de contorno para obtener respuestas de simetría entre 0.4 y 2.0. Si sobreponemos esta gráfica a la gráfica de contornos para tiempo de retención podemos predecir las condiciones en las cuales se obtengan tiempos de retención menores de 15 minutos y simetría de aproximadamente 1.0 que es el valor ideal.



La flecha señala uno de los puntos en el que se interceptan las líneas de contorno tanto para tiempo de retención y simetría indicando que a una polaridad de 59 % de H₂O y un pH de 3.7 se puede obtener una señal cromatográfica a los 20 minutos con una simetría de 0.8, que sería lo más cercano a la simetría de 1.0, sin embargo se observa que la línea de simetría de 1.0 no se intercepta con ninguna de las líneas de contorno de tiempo de retención deseados, se interceptaría tal vez con una línea de contornos de tiempo de retención mayor a 20 minutos, lo que ya no nos interesa debido a que el tiempo de análisis sería muy largo lo que no nos convendría para un análisis de rutina.

4) Análisis numérico para la respuesta de simetría:

Tabla 10.- Análisis de varianza para simetría

Fuente de variación	Totales	1	2	Efecto	Suma de Cuadrados	Df	SCM	F calc.	F tab (0.05)
1	1.08	1.97	8.14	2.035	8.28245	0			
A: Polaridad	0.89	6.17	-0.46	-0.115	0.02645	1	0.02645	36.48275862	7.71
B: pH	3.22	-0.19	4.2	1.05	2.205	1	2.205	3041.37931	7.71
AB	2.95	-0.27	-0.08	-0.02	0.0008	1	0.0008	1.103448276	7.71
Error					0.0029	4	0.000725		
Total					2.23515	7			

En la tabla 10 se observa que los dos factores tienen efecto significativo sobre la respuesta de simetría, ya que se observan valores de F calculada mayores a los de F de tablas a un nivel de confianza de 95%, pero la interacción de los dos factores no proporciona un efecto significativo sobre la respuesta de simetría, ya que el valor de F calculada es menor al valor de F de tablas.

La ecuación que describe este modelo se obtiene mediante una transformación matemática y un ajuste por mínimos cuadrados para la respuesta de simetría*.

* Estos cálculos se realizaron con ayuda del programa de computación estadístico llamado STATGRAPHICS

De donde se obtienen los coeficientes que se muestran en la siguiente tabla:

Fuente de variación	Coefficientes de regresión
1	-0.56625
A: Polaridad	-0.00875
B: pH	0.82
AB	-0.005

Quedando la ecuación del modelo de la siguiente manera:

$$\text{Simetría} = -0.56625 - 0.00875 \cdot \text{Polaridad} + 0.82 \cdot \text{pH} - 0.005 \cdot \text{Polaridad} \cdot \text{pH}$$

Mediante esta ecuación se puede establecer la relación existente entre los factores y la respuesta.

Al comparar los valores obtenidos al reproducir el método bibliográfico con los datos obtenidos del diseño de experimentos se encontró lo siguiente:

Al reproducir el método bibliográfico se ocupó una polaridad de 57 % de H₂O y un pH de 3.9, si sustituimos estos valores en la ecuación del modelo de la respuesta de tiempo de retención se tiene lo siguiente:

$$\text{Tr} = 161.468 - 3.80394 \cdot (57) - 59.9070 \cdot (3.9) + 1.39744 \cdot (57) \cdot (3.9) = \mathbf{21.657 \text{ min}}$$

El valor calculado de tiempo de retención no coincide con la información arrojada al reproducir el método bibliográfico donde el Clorhidrato de Bromhexina sale a un tiempo de 8.9 minutos. Esto se debe a que en el intervalo de pH que se trabajó (3 a 5), la respuesta de tiempo de retención no se comporta de manera lineal y la ecuación se obtuvo ajustando por mínimos cuadrados a un modelo lineal, lo que no corresponde con lo experimental.

Si se sustituyen los mismos valores para cada factor en la ecuación del modelo para la respuesta de simetría se obtiene lo siguiente:

$$\text{Simetría} = -0.56625 - 0.00875 \cdot (57) + 0.82 \cdot (3.9) - 0.005 \cdot (57) \cdot (3.9) = \mathbf{1.0215 \text{ min}}$$

El valor de simetría para la señal de Clorhidrato de Bromhexina al reproducir el método bibliográfico fue de 1.06, lo que sí corresponde con el valor calculado por medio de la ecuación del modelo.

Debido a que el valor calculado de tiempo no corresponde con lo obtenido experimentalmente se decidió mantener el pH del método bibliográfico (3.9) con el que se obtienen valores de simetría cercanos a 1.0 y modificar sólo la polaridad de la fase móvil.

Se probó la siguiente fase móvil:

Acetonitrilo : Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (37:63):

Los resultados obtenidos con este fase móvil son los que se muestran en la tabla 11.

Tabla 11.-Datos obtenidos con Fase móvil Acetonitrilo : Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (37:63)

Compuesto	Tr (min)	Rs
Benzoato de sodio	1.5	—
Metil-4-hidroxibenzoato	1.9	2.5
Propil-4-hidroxibenzoato	4.5	17.2
Clorhidrato de Bromhexina	12.5	21.1

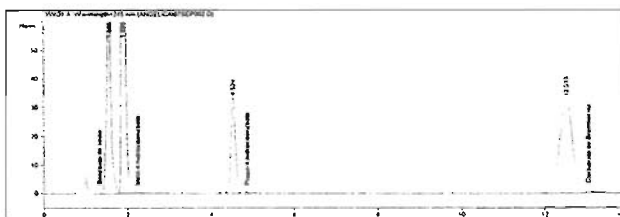


Figura 13.- Cromatograma de solución de mezcla de estándares obtenido con fase móvil Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (37: 63)

Con este sistema de medición se resolvieron adecuadamente las cuatro señales cromatográficas, teniéndose un tiempo de análisis de 14 minutos aproximadamente lográndose identificar cada señal cromatográfica, por lo que este procedimiento analítico fue el que se validó.

Los cromatogramas representativos de cada producto con este sistema de medición son los siguientes:

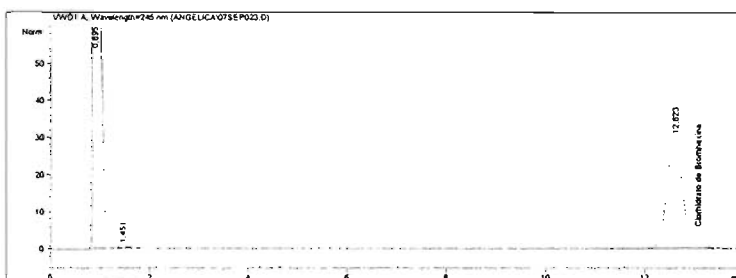


Figura 14.-Cromatograma de muestra de cápsulas 500mg/8mg

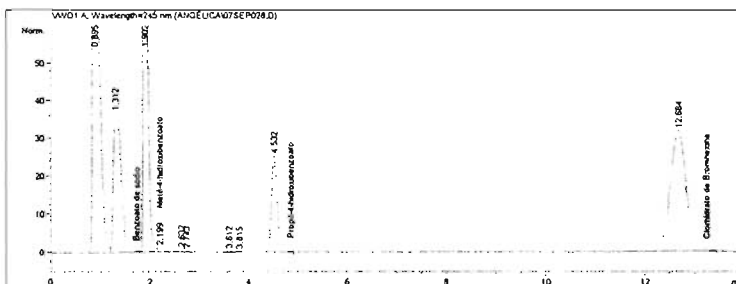


Figura 15.-Cromatograma de muestra de suspensión de 250mg/8mg

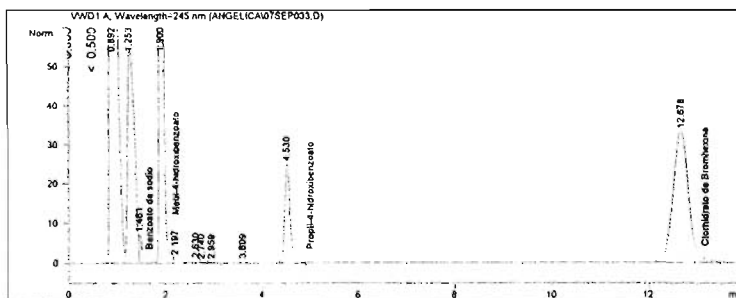


Figura 16.- Cromatograma de muestra de suspensión de 500mg/8mg

3.2.- Validación del método analítico

El método analítico a validar es el siguiente:

Los subprocesos de muestreo, tratamiento de la muestra y manejo de datos se muestran en la página 25 y 26, mientras que el subproceso de medición es el siguiente:

Equipo: Agilent modelo 1100

Detector: U.V./Vis

Columna: Nova Pak c18, 3.9 * 150 mm, 4 μ s.

Fase móvil: Acetonitrilo: Solución de TEA 0.015 M pH 3.9 (37:63)

Flujo: 1.0 mL / min

Volumen de inyección: 20.0 μ L

Longitud de onda: 245 nm

3.2.1.- Adecuabilidad del sistema

En la tabla 12 se muestran los datos representativos obtenidos de la adecuabilidad del sistema correspondiente al Clorhidrato de Bromhexina y en la tabla 13 se incluyen algunos datos de las señales cromatográficas de los conservadores.

Tabla 12.- Datos de adecuabilidad del sistema para la señal de Clorhidrato de Bromhexina

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA						
FASE	TR	AREA	N	T	R	K'
1	12.51	726.16	7848	1.09	21.06	9.27
2	12.51	725.28	7850	1.08	21.06	9.27
3	12.52	724.79	7977	1.08	21.19	9.28
4	12.53	724.33	7980	1.08	21.2	9.28
5	12.53	724.64	7988	1.07	21.13	9.28
6	12.53	723.99	7871	1.06	21.1	9.28
7	12.54	724.15	7999	1.07	21.24	9.29
PROMEDIO	12.53	724.76	7930	1.08	21.14	9.28
DESVIACION ESTANDAR	0.01	0.75	70.04	0.01	0.07	0.01
COEFICIENTE DE VARIACION	0.08	0.1038	0.88	0.91	0.34	0.07

Tabla 13.-Datos de adecuabilidad del sistema para las señales cromatográficas de Clorhidrato de Bromhexina y de los conservadores

	Clorhidrato de Bromhexina	Benzoato de sodio	Metil-4-hidroxibenzoato	Propil-4-hidroxibenzoato
Tiempo de retención (Tr)	Aprox. 12.5 min	Aprox. 1.5 min	Aprox. 1.9 min	Aprox. 4.0 min
Coleo (T)	1.08	1.21	0.73	0.79
Resolución (R)	Mayor a 2.5 entre el benzoato de sodio y el propil-4-hidroxibenzoato Mayor a 17.2 entre el metil-4-hidroxibenzoato y el propil-4-hidroxibenzoato Mayor a 21 entre propil-4-hidroxibenzoato y el clorhidrato de bromhexina			

Criterio de aceptación: C.V. < 2%, $k' > 2$, $R_s > 2$, T 0.5 – 2.0 ,
Tr aproximadamente constante.

Se logra separar adecuadamente tanto a los 3 conservadores (benzoato de sodio, metil-4-hidroxibenzoato y propil-4-hidroxibenzoato) como al compuesto de interés que es el Clorhidrato de Bromhexina, y esto se puede observar debido a que los valores de resolución obtenidos son mayores a 2.5 en todos los casos por lo que se pueden identificar correctamente las cuatro señales cromatográficas obtenidas.

En cuanto a la señal de Clorhidrato de Bromhexina se observa un coeficiente de variación menor al 2% de la respuesta de área, una k' mayor a 2, un coleo de 1.08 y un tiempo de retención de 12.5 minutos, parámetros que cumplen con el criterio de aceptación establecido para esta prueba.

3.2.2.- Selectividad

- a. Los cromatogramas representativos de las soluciones de cada producto que se sometieron a degradación por calentamiento son los siguientes:

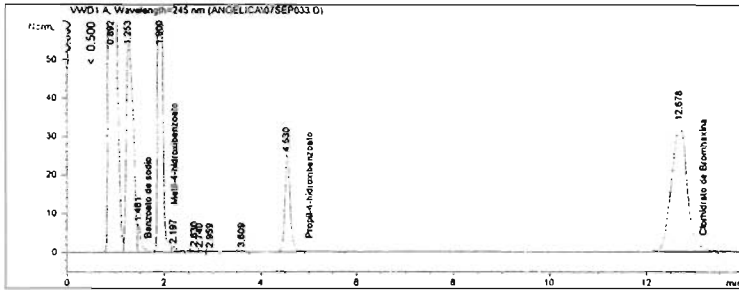


Figura 17.- Solución de cápsulas de 500mg /8mg que se sometió a degradación con calentamiento(15 días)

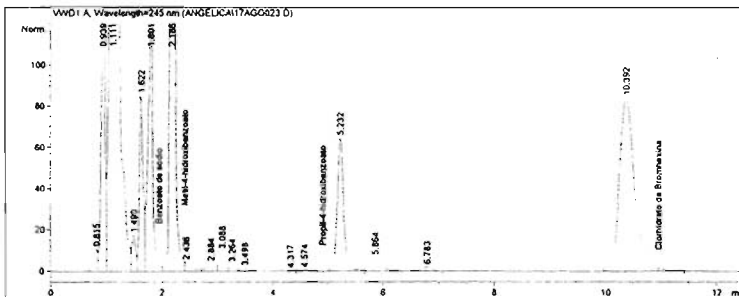


Figura 18.- Solución de suspensión de 250mg /8mg que se sometió a degradación con calentamiento (15 días)

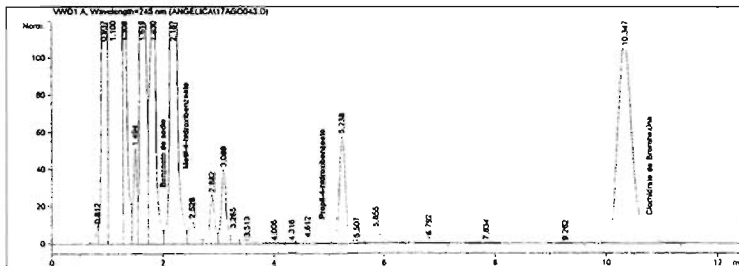


Figura 19.- Solución de suspensión de 500mg / 8mg que se sometió a degradación con calentamiento (15 días)

Al someter soluciones de cada producto a condiciones de estrés con calentamiento se generan varios productos de degradación, pero ninguno interfiere con la señal de Clorhidrato de Bromhexina.

- b. Los cromatogramas representativos de las soluciones de cada producto que se sometieron a degradación por hidrólisis ácida son los siguientes:

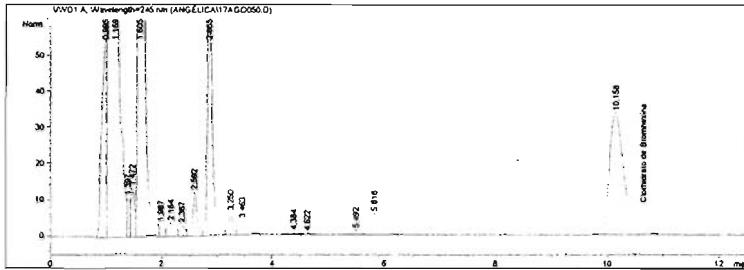


Figura 20.-Solución de cápsulas que se sometió a degradación ácida (15 días)

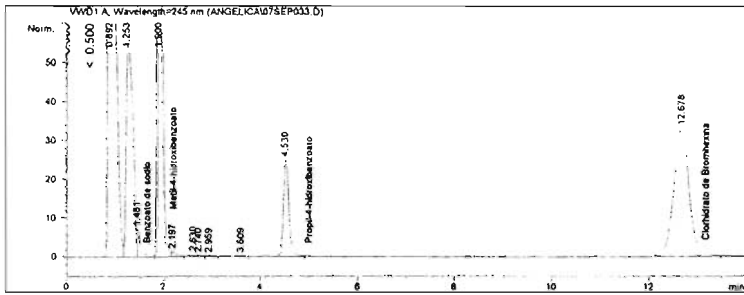


Figura 21.- Solución de suspensión de 250mg /8mg que se sometió a degradación ácida (15 días)

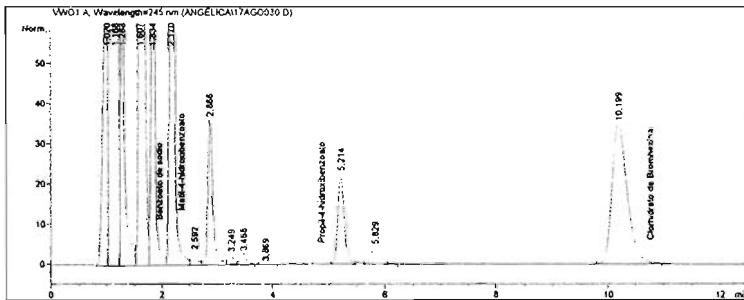


Figura 22.- Solución de suspensión de 500mg /8mg que se sometió a degradación ácida (15 días)

Al someter las soluciones de cada producto a condiciones de hidrólisis ácida se generan productos de degradación en menor cantidad que con calentamiento, sin embargo ninguna señal interfiere con la de Clorhidrato de Bromhexina.

- c. Los cromatogramas representativos de las soluciones de cada producto que se sometieron a degradación por hidrólisis básica son los siguientes:

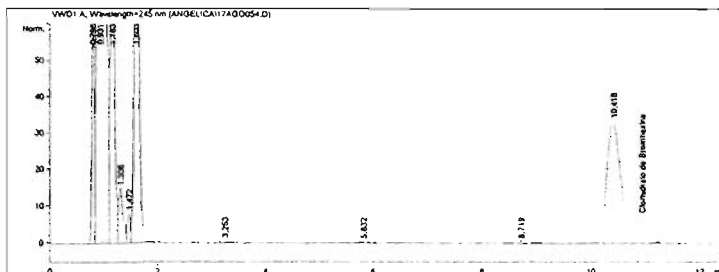


Figura 23.- Solución de cápsulas que se sometió a degradación básica (15 días)

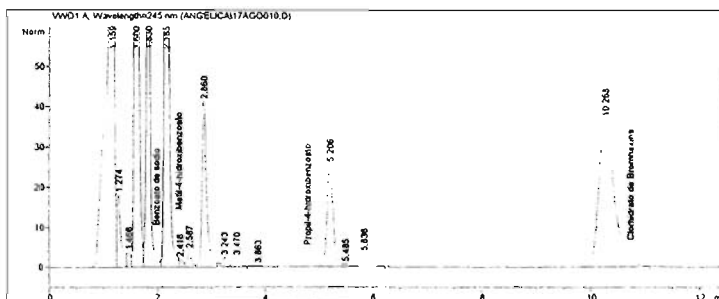


Figura 24.- Solución de suspensión de 250mg /8mg que se sometió a degradación básica (15 días)

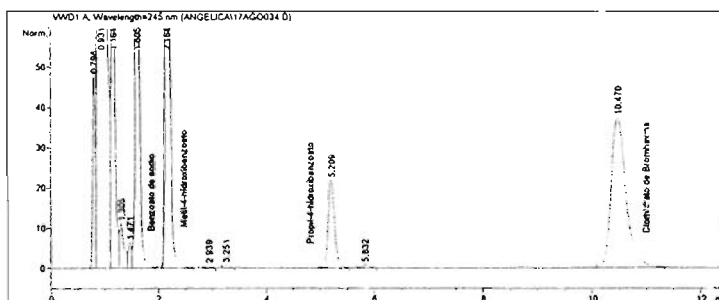


Figura 25.- Solución suspensión de 500 mg / 8 mg que se sometió a degradación básica (15 días)

Al someter las soluciones de cada producto a hidrólisis básica se generan productos de degradación que no interfieren con la señal de Clorhidrato de Bromhexina.

- d. Los cromatogramas representativos de las soluciones de cada producto que se sometieron a degradación por oxidación son los siguientes:

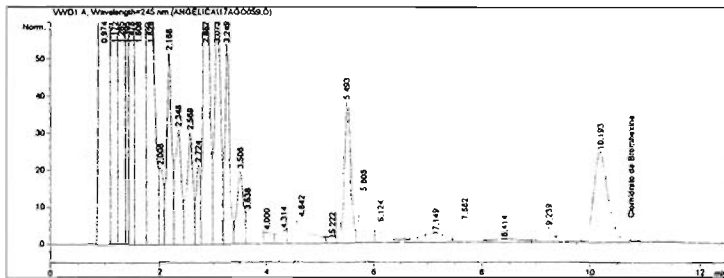


Figura 26.- Solución de cápsulas de 500mg/8mg que se sometió a degradación con H₂O₂ (15 días)

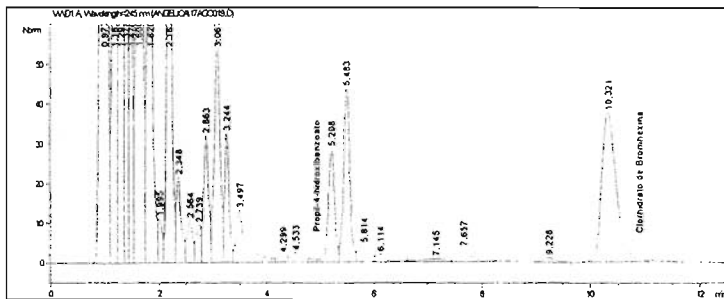


Figura 27.- Solución de suspensión de 250mg/8mg que se sometió a degradación con H₂O₂ (15 días)

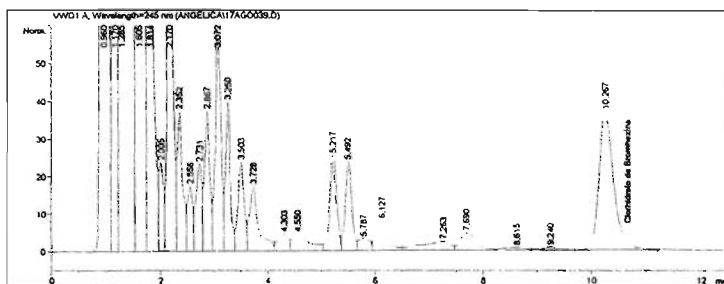


Figura 28.- Solución de suspensión de 500mg/8mg que se sometió a degradación con H₂O₂ (15 días)

Al someter las soluciones de cada producto a condiciones de oxidación se generaron muchos productos de degradación, pero ninguno interfiere con la señal de Clorhidrato de Bromhexina.

Criterio de aceptación: Los productos de degradación no deben interferir con la señal del compuesto de interés.

Los cromatogramas de las demás soluciones que se sometieron a condiciones de estrés se encuentran en el apéndice en las figuras 34-67.

Se puede observar en todos los casos que se generan muchos productos de degradación, sobre todo cuando se sometieron las soluciones a degradación con H_2O_2 , pero ninguno interfiere con la señal del Clorhidrato de Bromhexina, por lo que se puede decir que el método analítico es selectivo para detectar Clorhidrato de Bromhexina.

3.2.3.- Linealidad del sistema

En la tabla 14 se muestran los resultados de linealidad del sistema.

TABLA 14.- Linealidad del sistema

NIVEL %	INYECCIÓN	CURVA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA (ÁREA)	FACTOR (ÁREA/Con.)
50	1	1	13	371.6	28.58
	2		13	371.2	28.55
	1	2	13	363.7	27.98
	2		13	357.9	27.53
80	1	1	20.8	564.3	27.13
	2		20.8	564.0	27.12
	1	2	20.8	564.0	27.12
	2		20.8	564.0	27.12
100	1	1	26	732.2	28.16
	2		26	732.5	28.17
	1	2	26	724.0	27.85
	2		26	724.1	27.85
120	1	1	31.2	830.4	26.61
	2		31.2	830.0	26.60
	1	2	31.2	848.7	27.20
	2		31.2	848.8	27.20
160	1	1	41.6	1150.6	27.66
	2		41.6	1150.6	27.66
	1	2	41.6	1150.1	27.65
	2		41.6	1148.2	27.60
Promedio=					27.57
Des. Est.=					0.56
C.V.=					2.0 %

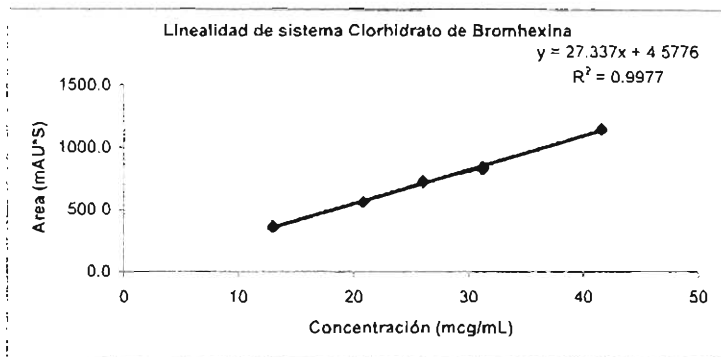


Figura 29.- Gráfica de Linealidad del sistema

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98 y el coeficiente de variación de la respuesta debe ser menor o igual a 2.0%.

Los datos presentados en la tabla 14 fueron analizados por medio de una Regresión lineal

Al hacer el análisis estadístico de valores área (y) contra concentración (x) se observa que existe una relación estadísticamente significativa entre ambos y que el modelo que describe dicha relación se ajusta a una línea recta, cuya ecuación es la siguiente:

$$Y = m \cdot x + b$$

$$y = 27.337x + 4.5776$$

Pendiente (m)=	27.337
Ordenada al origen (b)=	4.5776
Coefficiente de correlación=	0.9988
Coefficiente de determinación (r^2)=	0.9977

Se puede observar que se presenta un comportamiento lineal en el intervalo de concentración de Clorhidrato de Bromhexina de 0.013 mg/mL a 0.0416 mg/mL con un coeficiente de determinación mayor a 0.98 y el coeficiente de variación del factor respuesta es igual a 2.0%, por lo que se cumple con el criterio de aceptación establecido para esta prueba.

3.2.4.- Precisión del sistema

Los resultados correspondientes a esta prueba son los que se presentan en la tabla 15.

Tabla 15.- Precisión del sistema
CLORHIDRATO DE BROMHEXINA

Inyección	Concentración (mg/mL)	Área (mAU*S)
1	0.026	726.165
2	0.026	725.277
3	0.026	724.797
4	0.026	724.334
5	0.026	724.637
6	0.026	723.990
PROMEDIO	0.026	724.867
DES EST	0.026	0.77
% C. V.	0.026	0.11

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación de la respuesta del compuesto de interés debe ser menor o igual a 1.5%.

Se aprecia con los resultados de la tabla 15 que el sistema es preciso, ya que la respuesta de las 6 inyecciones sucesivas tienen un coeficiente de variación menor a 1.5%.

3.2.5.- Linealidad del método

En la tabla 16 se muestran los resultados de linealidad del método analítico para cápsulas.

Tabla 16.- Linealidad del método para cápsulas

Cápsulas de 500mg / 8mg				
Curva	Nivel de concentración	No. de Inyección	mg/mL adicionados (x)	mg/mL recuperados (y)
1	60	1	0.01566	0.01567
		2	0.01566	0.01562
		3	0.01566	0.01565
2	60	1	0.01566	0.01554
		2	0.01566	0.01555
		3	0.01566	0.01554
3	60	1	0.01566	0.01538
		2	0.01566	0.01540
		3	0.01566	0.01539
1	100	1	0.0261	0.02626
		2	0.0261	0.02623
		3	0.0261	0.02621
2	100	1	0.0261	0.02598
		2	0.0261	0.02594
		3	0.0261	0.02595
3	100	1	0.0261	0.02597
		2	0.0261	0.02595
		3	0.0261	0.02594
1	140	1	0.03654	0.037098
		2	0.03654	0.03705
		3	0.03654	0.03704
2	140	1	0.03654	0.03677
		2	0.03654	0.03669
		3	0.03654	0.03676
3	140	1	0.03654	0.03625
		2	0.03654	0.03618
		3	0.03654	0.03614

A continuación se muestra la gráfica de mg/mL adicionados (x) contra mg/mL recuperados:

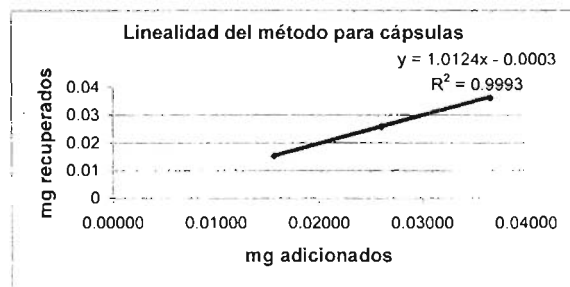


Figura 30.- Gráfica de linealidad del método para cápsulas

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente de uno.

Al hacer una regresión lineal de los valores de mg/mL adicionados (x) contra mg/mL recuperados (y) se obtiene la siguiente ecuación de la recta:

$Y = m x + b$	$y = 1.0124 x - 0.0003$
Pendiente (m) =	1.0124
Ordenada al origen (b) =	-0.0003
Coefficiente de correlación (r) =	0.9996
Coefficiente de determinación (r^2) =	0.9993
$t_{(0.95, 25)} =$	1.7081

Intervalo de confianza para la pendiente (95%, 25 g.l.) = -1.0494 a 3.0742

Intervalo de confianza para la ordenada (95%, 25 g.l.) = -0.0005978 a -0.0000879

Coefficiente de variación de la regresión = 0.9233

Con los datos anteriores se puede observar que existe una relación estadísticamente significativa entre los mg/mL adicionados y recuperados de Clorhidrato de Bromhexina en cápsulas y que el modelo se ajusta a una línea recta con un coeficiente de correlación de 0.9996. El coeficiente de determinación es mayor a 0.98 cumpliendo así con el criterio de aceptación establecido para esta prueba, siendo la pendiente no significativamente diferente de 1 y siendo la ordenada al origen cercana a cero. El coeficiente de variación de la regresión es menor de 2.0% Por lo que el método es lineal para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en cápsulas.

En la tabla 17 se muestran los resultados de linealidad del método para suspensiones de 250 mg/8mg

Tabla 17.- Linealidad del método para suspensiones de 250mg/8mg

Suspensión de 250mg/8mg				
Curva	Nivel de concentración	No. de Inyección	mg/mL adicionados (x)	mg/mL recuperados (y)
1	60	1	0.0156	0.01533
		2	0.0156	0.01533
		3	0.0156	0.01534
2	60	1	0.0156	0.01524
		2	0.0156	0.015198
		3	0.0156	0.01522
3	60	1	0.0156	0.01523
		2	0.0156	0.01526
		3	0.0156	0.01525
1	100	1	0.026	0.02585
		2	0.026	0.02582
		3	0.026	0.02589
2	100	1	0.026	0.02560
		2	0.026	0.02558
		3	0.026	0.02556
3	100	1	0.026	0.02584
		2	0.026	0.02582
		3	0.026	0.02582
1	140	1	0.0364	0.03639
		2	0.0364	0.03625
		3	0.0364	0.03618
2	140	1	0.0364	0.036397
		2	0.0364	0.03641
		3	0.0364	0.03645
3	140	1	0.0364	0.03618
		2	0.0364	0.03603
		3	0.0364	0.03599

A continuación se muestra la gráfica de mg/mL adicionados (x) contra mg/mL recuperados:

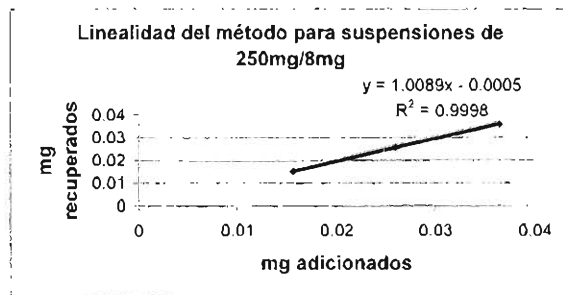


Figura 31.- Gráfica de linealidad del método para suspensiones de 250mg/8mg

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente de uno.

Al hacer una regresión lineal de los valores de mg/mL adicionados (x) contra mg/mL recuperados (y) se obtiene la siguiente ecuación de la recta:

$$Y = m x + b \qquad y = 1.0089 x - 0.0005$$

$$\text{Pendiente (m) =} \qquad 1.0089$$

$$\text{Ordenada al origen (b) =} \qquad -0.0005$$

$$\text{Coeficiente de correlación (r) =} \qquad 0.9999$$

$$\text{Coeficiente de determinación (r}^2\text{) =} \qquad 0.9998$$

$$t_{(0.95, 25)} = \qquad 1.7081$$

$$\text{Intervalo de confianza para la pendiente (95\%, 25 g.l.) = -1.0567 a 3.0746}$$

$$\text{Intervalo de confianza para la ordenada (95\%, 25 g.l.) = -0.0006065 a -0.0003405}$$

$$\text{Coeficiente de variación de la regresión =} \qquad 0.4876$$

Con los datos anteriores se puede observar que existe una relación estadísticamente significativa entre los mg/mL adicionados y recuperados de Clorhidrato de Bromhexina en las suspensiones de 250mg/8mg y que el modelo se ajusta a una línea recta con un coeficiente de correlación de 0.9999. El coeficiente de determinación es mayor a 0.98 cumpliendo así con el criterio de aceptación establecido para esta prueba, siendo la pendiente no significativamente diferente de 1 y siendo la ordenada al origen cercana a cero. El coeficiente de variación de la regresión es menor de 2.0%. Por lo que el método es lineal para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en suspensiones de 250mg/8mg.

En la tabla 18 se muestran los resultados de linealidad del método para suspensiones de 500mg/8mg.

Tabla 18.- Linealidad del método para suspensiones de 500 mg / 8mg

Suspensión de 500mg/8mg				
Curva	Nivel de concentración	No. de Inyección	mg/mL adicionados (x)	mg/mL recuperados (y)
1	60	1	0.0156	0.01537
		2	0.0156	0.01535
		3	0.0156	0.01536
2	60	1	0.0156	0.01516
		2	0.0156	0.01512
		3	0.0156	0.01511
3	60	1	0.0156	0.01537
		2	0.0156	0.01533
		3	0.0156	0.01532
1	100	1	0.026	0.02587
		2	0.026	0.02584
		3	0.026	0.02587
2	100	1	0.026	0.02583
		2	0.026	0.02576
		3	0.026	0.02573
3	100	1	0.026	0.025796
		2	0.026	0.02577
		3	0.026	0.02571
1	140	1	0.0364	0.03645
		2	0.0364	0.03630
		3	0.0364	0.03628
2	140	1	0.0364	0.036199
		2	0.0364	0.03613
		3	0.0364	0.03616
3	140	1	0.0364	0.03597
		2	0.0364	0.03593
		3	0.0364	0.03593

A continuación se muestra la gráfica de mg/mL adicionados (x) contra mg/mL recuperados:

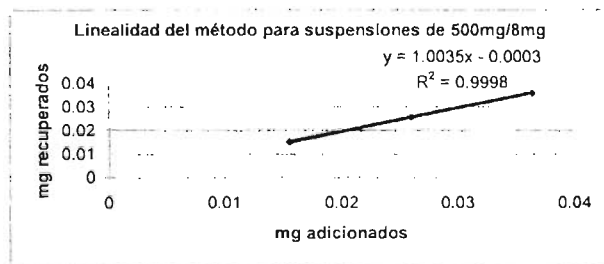


Figura 32.- Gráfica de linealidad del método para suspensiones de 500mg/8mg

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente de uno.

Al hacer una regresión lineal de los valores de mg/mL adicionados (x) contra mg/mL recuperados (y) se obtiene la siguiente ecuación de la recta:

$Y = m x + b$	$y = 1.0035 x - 0.0003$
Pendiente (m) =	1.0035
Ordenada al origen (b) =	-0.0003
Coeficiente de correlación (r) =	0.9999
Coeficiente de determinación (r^2) =	0.9998
$t_{(0.95, 25)} =$	1.7081
Intervalo de confianza para la pendiente (97.5%, 25 g.l.) =	-1.0622 a 3.0691
Intervalo de confianza para la ordenada (97.5%, 25 g.l.) =	-0.0004878 a -0.0002101
Coeficiente de variación de la regresión =	0.5094

Con los datos anteriores se puede observar que existe una relación estadísticamente significativa entre los mg/mL adicionados y recuperados de Clorhidrato de Bromhexina en las suspensiones de 500mg/8mg y que el modelo se ajusta a una línea recta con un coeficiente de correlación de 0.9999. El coeficiente de determinación es mayor a 0.98 cumpliendo así con el criterio de aceptación establecido para esta prueba, siendo la pendiente no significativamente diferente de 1 y siendo la ordenada al origen cercana a cero. El coeficiente de variación de la regresión es menor de 2.0%. Por lo que el método es lineal para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en suspensiones de 500mg/8mg.

3.2.6-. Exactitud del método

En la tabla 19 se muestran los resultados de exactitud obtenidos para cápsulas a los tres niveles de concentración de Clorhidrato de Bromhexina.

Tabla 19.- Exactitud de Cápsulas 500mg /8mg

Nivel %	No. de inyección	mg/mL		% de recobro		
		Adicionados	Recuperados			
60	1	0.01566	0.01567	100.1		
	2	0.01566	0.01562	99.8		
	3	0.01566	0.01565	99.9		
	1	0.01566	0.01554	99.2		
	2	0.01566	0.01555	99.3		
	3	0.01566	0.01554	99.2		
	1	0.01566	0.01538	98.2	Promedio	99.1
	2	0.01566	0.01540	98.3	Des est	0.7
	3	0.01566	0.01539	98.3	%C.V.	0.7
100	1	0.026100	0.026266	100.6		
	2	0.026100	0.026230	100.5		
	3	0.026100	0.026206	100.4		
	1	0.026100	0.025984	99.6		
	2	0.026100	0.025942	99.4		
	3	0.026100	0.025951	99.4		
	1	0.026100	0.025967	99.5	Promedio	99.8
	2	0.026100	0.025953	99.4	Des. est	0.5
	3	0.026100	0.025939	99.4	%C.V.	0.5
140	1	0.036540	0.037098	101.5		
	2	0.036540	0.037048	101.4		
	3	0.036540	0.037038	101.4		
	1	0.036540	0.036775	100.6		
	2	0.036540	0.036692	100.4		
	3	0.036540	0.036761	100.6		
	1	0.036540	0.036254	99.2	Promedio	100.3
	2	0.036540	0.036183	99.0	Des. est	1.0
	3	0.036540	0.036138	98.9	%C.V.	1.0

PROMEDIO Global=	99.8%
Des. est Global=	0.8
C V global=	0.8%

RESULTADO: Recobro promedio de 99.8

CRITERIO: Recobros del 98 % al 102 %

En la tabla 19 se observa que los promedios de los porcentajes de recuperación a cada nivel de concentración de Clorhidrato de Bromhexina cumplen con el criterio de aceptación especificado para esta prueba, incluso con un coeficiente de variación menor a 2.0%. Por lo que el método es exacto para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en cápsulas.

Tabla 20.- Exactitud de Suspensión de 250mg/8mg

Nivel %	No de inyección	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% de recobro	
60	1	0.0156	0.01539	98.7	
	2	0.0156	0.01539	98.6	
	3	0.0156	0.0154	98.7	
	1	0.0156	0.0153	98.1	
	2	0.0156	0.01526	97.8	
	3	0.0156	0.01528	98	
	1	0.0156	0.01529	98	Promedio 98.2
	2	0.0156	0.01532	98.2	Des. est 0.3
	3	0.0156	0.01531	98.1	%C.V. 0.3
100	1	0.0261	0.025948	99.4	
	2	0.0261	0.025923	99.3	
	3	0.0261	0.025991	99.6	
	1	0.0261	0.025703	98.5	
	2	0.0261	0.025678	98.4	
	3	0.0261	0.02566	98.3	
	1	0.0261	0.025945	99.4	Promedio 99.1
	2	0.0261	0.02592	99.3	Des. est 0.5
	3	0.0261	0.02592	99.3	%C.V. 0.5
140	1	0.03654	0.036526	100	
	2	0.03654	0.036391	99.6	
	3	0.03654	0.036316	99.4	
	1	0.03654	0.036537	100	
	2	0.03654	0.036551	100	
	3	0.03654	0.036594	100.1	
	1	0.03654	0.036323	99.4	Promedio 99.6
	2	0.03654	0.03617	99	Des. est 0.5
	3	0.03654	0.036128	98.9	%C.V. 0.5

PROMEDIO global=	99 %
Des. est Global=	0.7
C.V Global=	0.7 %

RESULTADO: Recobro promedio de 99.0 %
Recobros del 98 % al 102 %

CRITERIO: 102 %

En la tabla 20 se observa que los promedios de los porcentajes de recuperación a cada nivel de concentración de Clorhidrato de Bromhexina cumplen con el criterio de aceptación especificado para esta prueba, incluso con un coeficiente de variación menor a 2.0%. Por lo que el método es exacto para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en suspensiones de 250mg/8mg.

Tabla 21.- Exacitid para Suspensión de 500mg/8mg

Nivel %	No de inyección	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% de recobro		
60	1	0.0156	0.01549	98.9		
	2	0.0156	0.01547	98.8		
	3	0.0156	0.01548	98.9		
	1	0.0156	0.01528	97.6		
	2	0.0156	0.01523	97.3		
	3	0.0156	0.01523	97.2		
	1	0.0156	0.01548	98.9	Promedio	98.3
	2	0.0156	0.01544	98.6	Des. est	0.7
	3	0.0156	0.01544	98.6	%C.V.	0.7
100	1	0.026	0.025973	99.5		
	2	0.026	0.025938	99.4		
	3	0.026	0.025966	99.5		
	1	0.026	0.025929	99.3		
	2	0.026	0.025855	99.1		
	3	0.026	0.025825	98.9		
	1	0.026	0.025896	99.2	Promedio	99.2
	2	0.026	0.025867	99.1	Des. est	0.2
	3	0.026	0.025815	98.9	%C.V.	0.2
140	1	0.0364	0.036594	100.1		
	2	0.0364	0.03644	99.7		
	3	0.0364	0.036415	99.7		
	1	0.0364	0.036338	99.4		
	2	0.0364	0.036265	99.2		
	3	0.0364	0.036296	99.3		
	1	0.0364	0.036111	98.8	Promedio	99.3
	2	0.0364	0.036068	98.7	Des. est	0.5
	3	0.0364	0.036073	98.7	%C.V.	0.5
PROMEDIO Global=				98.9 %		
Des. est Global=				0.7		
C V Global=				0.7 %		

RESULTADO: Recobro promedio de 98.9 %

CRITERIO: Recobros del 98 % al 102 %

En la tabla 21 se observa que los promedios de los porcentajes de recuperación a cada nivel de concentración de Clorhidrato de Bromhexina cumplen con el criterio de aceptación especificado para esta prueba, incluso con un coeficiente de variación menor a 2.0%.

Por lo que el método es exacto para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en suspensiones de 250mg/8mg.

3.2.7.- Precisión

3.2.7.1.- Repetibilidad

En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos de repetibilidad en cápsulas.

Tabla 22.- Repetibilidad de Cápsulas de 500mg/8mg

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA		
DIA	MUESTRA	% DE RECOBRO
1	1	99.4
		99.3
		99.0
	2	96.9
		96.7
		96.5
	3	101.0
		100.7
		100.6
2	1	98.9
		98.6
		98.3
	2	98.7
		98.7
		98.6
	3	100.5
		100.4
		100.4

Promedio = 99.1%

Desviación estandar = 1.4

% C. V. = 1.4 %

RESULTADOS: El % C. V. es de 1.4 %

CRITERIO: El % C.V. debe ser menor o igual al 1.5 %

En la tabla 22 se observa que el método es repetible, debido a que el coeficiente de variación de los recobros es menor a 1.5%.

En la tabla 23 se muestran los resultados de repetibilidad en suspensiones de 250mg/8mg.

Tabla 23.- Repetibilidad de Suspensión de 250mg/8mg

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA		
DÍA	MUESTRA	% DE RECOBRO
1		100.8
	1	100.7
		100.6
		99.8
	2	99.5
		99.2
		99.1
	3	98.7
		98.4
2		100.0
	1	99.9
		99.8
		103.3
	2	103.3
		103.3
		100.9
	3	100.6
		100.3

Promedio = 100.4%

Desviación estándar = 1.5

% C.V. = 1.5%

RESULTADOS: El % C.V. es de 1.5 %

CRITERIO: El % C.V. debe ser menor o igual al 1.5 %

Se observa que el método es repetible para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en suspensiones de 250mg/8mg, ya que el coeficiente de variación es igual a 1.5% cumpliendo con el criterio de aceptación especificado para esta prueba.

En la tabla 24 se muestran los resultados de repetibilidad en suspensiones de 500mg/8mg.

Tabla 24.- Repetibilidad en Suspensión de 500mg/8mg

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA		
DÍA	MUESTRA	% DE RECOBRO
1		99.4
	1	99.3
		99.0
		96.9
	2	96.7
		96.5
		101.0
	3	100.7
		100.6
2		98.9
	1	98.6
		98.3
		98.7
	2	98.7
		98.6
		100.5
	3	100.4
		100.4

Promedio = 99.1%
 Desviación estándar = 1.4
 % C.V. = 1.4%

RESULTADOS: El % C.V. es de 1.4 %

CRITERIO: El % C.V. debe ser menor o igual al 1.5 %

Se observa que el método es repetible para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en suspensiones de 500mg/8mg, ya que el coeficiente de variación es de 1.4% cumpliendo con el criterio de aceptación especificado para esta prueba.

3.2.7.2.- Precisión intermedia

En la tabla 25 se muestran los resultados de precisión intermedia para cápsulas.

Tabla 25.- Precisión intermedia de cápsulas

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA						
DÍA	MUESTRA	INYECCIÓN	% RECOBRO			
			ANALISTA 1	ANALISTA 2		
1	1	1	98.8	99.4		
		2	98.6	99.3		
		3	98.6	99		
	2	1	100.1	96.9		
		2	100.1	96.7		
		3	100	96.5		
	3	1	102	101	Promedio	99.6%
		2	101.9	100.7	Des. est	1.7
		3	101.9	100.6	%C.V	1.7%
2	1	1	102.8	98.9		
		2	102.4	98.6		
		3	102.2	98.3		
	2	1	103	98.7		
		2	102.6	98.7		
		3	102.2	98.6		
	3	1	103.8	100.5	Promedio	101.0%
		2	103.3	100.4	Des. est	2.0
		3	103.1	100.4	%C.V	2.0%
		Promedio	101.5%	99.1%		
		Des. est	1.7	1.4		
		%C.V	1.7%	1.4%		
PROMEDIO Global			100.3%			
DES. EST Global			2			
C.V. Global (%)			2%			

RESULTADO: El % C.V. global obtenido es de 2.0%

CRITERIO DE ACEPTACION: El % C.V. debe ser menor o igual a 2.0%

En la tabla 25 se observa que el coeficiente de variación tanto de los analistas, como por día como el global es menor o igual a 2.0%, cumpliendo con el criterio establecido para esta prueba.

En la tabla 26 se muestran los resultados de precisión intermedia de las suspensiones de 250mg/8mg.

Tabla 26.- Precisión intermedia de Suspensión de 250mg/8mg

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA							
DÍA	MUESTRA	INYECCIÓN	% RECOBRO				
			ANALISTA 1	ANALISTA 2			
1	1	1	97	100.8			
		2	96.8	100.7			
		3	96.8	100.6			
	2	1	98.1	99.8			
		2	98.2	99.5			
		3	98.1	99.2			
	3	1	97.3	99.1	Promedio	99.6%	
		2	96.9	98.7	Des. est	0.9	
		3	96.9	98.4	%C.V	0.9%	
2	1	1	101.2	100			
		2	101.2	99.9			
		3	101	99.8			
	2	1	100.7	103.3			
		2	100.7	103.3			
		3	100.4	103.3			
	3	1	99.7	100.9	Promedio	101.3%	
		2	99.7	100.6	Des. est	1.6	
		3	99.6	100.3	%C.V	1.5%	
			Promedio	98.9%	100.5%		
			Des. est	1.7	1.5		
			% C.V.	1.7%	1.5%		
PROMEDIO Global			99.7%				
DES. EST Global			1.8				
C. V. Global (%)			1.8%				

RESULTADO: El % C.V. global obtenido es de 1.8%

CRITERIO DE ACEPTACION: El % C.V. debe ser menor o igual a 2.0%

En la tabla 26 se observa que el coeficiente de variación tanto de los analistas, como por día, como el global es menor a 2.0%, cumpliendo con el criterio establecido para esta prueba.

En la tabla 27 se muestran los resultados de precisión intermedia de las suspensiones de 500mg/8mg.

Tabla 27.- Precisión intermedia de Suspensión de 500mg/8mg

CLORHIDRATO DE BROMHEXINA							
DÍA	MUESTRA	INYECCIÓN	% RECOBRO				
			ANALISTA 1	ANALISTA 2			
1	1	1	98.8	99.4			
		2	98.6	99.3			
		3	98.6	99			
	2	1	100.1	96.9			
		2	100.1	96.7			
		3	100	96.5			
	3	1	102	101	Promedio	98.9%	
		2	101.9	100.7	Des. est	1.8	
		3	101.9	100.6	%C.V	1.8%	
2	1	1	102.8	98.9			
		2	102.4	98.6			
		3	102.2	98.3			
	2	1	103	98.7			
		2	102.6	98.7			
		3	102.2	98.6			
	3	1	103.8	100.5	Promedio	99.2%	
		2	103.3	100.4	Des. est	0.9	
		3	103.1	100.4	%C.V	0.9%	
			Promedio	101.5%	99.1%		
			Des. est	1.7	1.4		
			% C.V.	1.7%	1.4%		
		PROMEDIO	100.3%				
		DES. EST	2				
		C.V. (%)	2.0%				

RESULTADO: El % C.V. global obtenido es de 2.0%

CRITERIO DE ACEPTACION: El % C.V. debe ser menor o igual a 2.0%

En la tabla 27 se observa que el coeficiente de variación tanto de los analistas, como por día, como el global es menor o igual a 2.0%, cumpliendo con el criterio establecido para esta prueba. Por lo que el método es preciso para cuantificar clorhidrato de Bromhexina en los tres productos.

3.2.8.- Estabilidad

3.2.8.1.- Estándares de Clorhidrato de Bromhexina al 100%

En las tablas 28, 29 y 30 se muestran los resultados correspondientes a la prueba de estabilidad de soluciones estándar de Clorhidrato de Bromhexina al 100%, bajo condiciones de almacenamiento de refrigeración, temperatura ambiente y luz y temperatura ambiente y oscuridad.

Tabla 28.- Estándares en refrigeración

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	100.0	0
24	99.8	0.2
48	100.2	0.2
96	99.8	0.2
120	99.6	0.4
168	99.0	1.0

Tabla 29.- Estándares a temperatura ambiente y luz

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	100.0	0
24	98.9	1.1
48	100.4	0.4
96	100.9	0.9
120	101.7	1.7
168	99.0	1.0

Tabla 30.- Estándares a temperatura ambiente y oscuridad

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	100.0	0
24	100.0	0
48	100.4	0.4
96	99.8	0.2
120	99.8	0.2
168	95.0	5.0

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de los promedios de % de recobro a cada condición de almacenaje con respecto al análisis inicial debe ser menor al 2%.

Las soluciones estándares son estables 168 h (7 días) bajo condiciones de almacenamiento de refrigeración y temperatura ambiente y luz., mientras que bajo condiciones de temperatura ambiente y oscuridad sólo son estables 120 h (5 días).

3.2.8.2.- Muestras

En las tablas 31 ,32 y 33 se muestran los resultados de estabilidad de soluciones de muestra de cápsulas bajo las condiciones de almacenamiento mencionadas:

Tabla 31.- Soluciones de cápsulas en refrigeración

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	89.3	0
24	89.4	0.1
48	89.3	0
72	90.0	0.7
120	89.3	0
144	89.3	0
192	88.7	0.6

Tabla 32.- Soluciones de cápsulas a temperatura ambiente y luz

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	89.3	0
24	89.3	0
48	89.4	0.1
72	90.2	0.9
120	90.2	0.8
144	90.9	1.6
192	88.0	1.3

Tabla 33.- Soluciones de cápsulas a temperatura ambiente y oscuridad

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	89.3	0
24	89.5	0.2
48	89.4	0.1
72	90.2	0.9
120	89.3	0
144	89.2	0.1
192	88.5	0.8

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de los promedios de % de recobro a cada condición de almacenaje con respecto al análisis inicial debe ser menor o igual a 2%.

Las soluciones de cápsulas de 500mg/8mg son estables 192 h (8 días) bajo las tres condiciones de almacenamiento, ya que la diferencia absoluta de los promedios de porcentaje de recuperación a cada condición con respecto al valor inicial son menores al 2%.

En las tablas 34, 35 y 36 se muestran los resultados de estabilidad de suspensiones de 250mg/8mg.

Tabla 34. - Soluciones de suspensión de 250mg/8mg en refrigeración

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	93.5	0
24	93.2	0.3
48	92.8	0.7
72	94.1	0.6
120	93.0	0.4
144	92.9	0.6
192	92.9	0.6

Tabla 35. - Soluciones de suspensión de 250mg/8mg a temperatura ambiente y luz

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	93.5	0
24	93.4	0.1
48	93.0	0.5
72	94.4	0.9
120	94.4	0.9
144	94.4	1.0
192	94.3	0.9

Tabla 36. - Soluciones de suspensión de 250mg/8mg a temperatura ambiente y oscuridad

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	93.5	0
24	93.8	0.3
48	93.4	0.1
72	93.8	0.3
120	93.5	0
144	94.2	0.7
192	90.6	2.9

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de los promedios de % de recobro a cada condición de almacenaje con respecto al análisis inicial debe ser menor o igual a 2%.

Las soluciones de suspensión de 250mg/8mg son estables 192 h (8 días) bajo condiciones de almacenamiento de refrigeración y temperatura ambiente y luz, mientras que bajo condiciones de temperatura ambiente y oscuridad son estables 144 h (6 días).

En las tablas 37, 38 y 39 se muestran los resultados de estabilidad de soluciones de suspensiones de 500 mg/8mg.

Tabla 37.- Soluciones de suspensión de 500mg/8mg en refrigeración

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	99.5	0
24	97.1	0.3
48	99.1	0.3
72	100.2	0.7
120	98.5	0.9
144	98.5	1.0
192	98.0	3.5

Tabla 38.- Soluciones de suspensión de 500mg/8mg a temperatura ambiente y luz

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	99.5	0
24	99.1	0.4
48	99.0	0.5
72	100.9	1.4
120	101.4	1.9
144	101.6	2.1
192	99.9	0.4

Tabla 39.- Soluciones de suspensión de 500mg/8mg a temperatura ambiente y oscuridad

Tiempo (h)	% recobro	% Diferencia
0	99.5	0
24	98.5	0.9
48	99.1	0.3
72	99.4	0.1
120	98.8	0.7
144	99.9	0.4
192	93.7	5.7

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de los promedios de % de recobro a cada condición de almacenaje con respecto al análisis inicial debe ser menor o igual a 2%.

Las soluciones de suspensión de 500mg/8mg son estables bajo condiciones de almacenamiento de refrigeración y temperatura ambiente y oscuridad 144 h (6 días), mientras que bajo condiciones de temperatura ambiente y oscuridad son estables 120 h (5 días).

3.2.8.3.- Fase móvil

La fase móvil se almacenó 7 días bajo condiciones de refrigeración y de temperatura ambiente y los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 40.- *Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil a temperatura ambiente*

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
Resolución	2.5	2.6

Tabla 41.- *Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil en refrigeración*

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
Resolución	2.5	2.6

Tabla 42.- *Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina en fase móvil a temperatura ambiente*

PARÁMETROS	TIEMPO (días)	
	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V (%)	0.6406	0.349
Area Promedio	600.9	601.9
Tiempo de retención	11.9084	11.5845
No. Platos teoricos	7350.36	7127.00
Coleo	0.89	0.918
Factor de capacidad	9.3	10.360
Resolución	21.4509	20.562

Tabla 43.- *Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina en fase móvil en refrigeración*

PARÁMETROS	TIEMPO (días)	
	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V. (%)	0.6406	0.41716
Area Promedio	600.9	602.3
Tiempo de retención	11.9084	11.5918
No. Platos teoricos	7350.36	7137.00
Coleo	0.89	0.9154
Factor de capacidad	9.3	10.420
Resolución	21.4509	20.5918

En el apéndice, en las tablas 64-69 se muestran los parámetros cromatográficos de las señales de los conservadores.

Se puede observar que los parámetros cromatográficos no variaron con respecto a los datos obtenidos al tiempo cero, por lo que se puede decir que la fase móvil es estable 7 días cuando se almacena tanto en condiciones de refrigeración como de temperatura ambiente.

3.2.9.-Tolerancia

En las tablas 44 y 45 se muestran los resultados obtenidos al variar la polaridad de la fase móvil como se menciona en la página 31.

Tabla 44.- *Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato*

Parámetro cromatográfico	Condición 1 (60 % H ₂ O)	Condición Normal (63 % H ₂ O)	Condición 2 (66 % H ₂ O)
Rs	2.2	2.5	3.4

Tabla 45.- *Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina al variar la proporción de la fase móvil*

Parámetro cromatográfico	Condición 1 (60 % H ₂ O)	Condición Normal (63 % H ₂ O)	Condición 2 (66 % H ₂ O)
Area promedio	737.2	725.0	742.9
Tr (min)	14.4	12.5	10.1
T	0.68	1.06	1.09
K'	10.8	9.3	7.2
R	17.7	21.3	19.0
N	7662	8023.0	6958
C.V.	0.4	0.3	0.5

En el apéndice, en las tablas 70-72 se muestran los parámetros cromatográficos de los conservadores.

Con los datos obtenidos se puede observar que al disminuir la polaridad de la fase móvil (condición 1), la resolución entre el benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato disminuye con respecto al valor obtenido bajo condiciones normales. Al aumentar la polaridad de la fase móvil la resolución entre ambos conservadores aumenta al igual que los tiempos de retención de los cuatro compuestos.

En las tablas 46 y 47 se muestran los resultados al cambiar de columna como se menciona en la página 31.

Tabla 46.- Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato al cambiar de columna

COLUMNA	Rs
1	2.5
2	3.2

Tabla 47.- Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina al cambiar de columna

Columna	N	T	K'	Tr (min)	C.V (%) Solución estándar
1	8023	1.1	9.3	12.5	0.3
2	5641	2.0	9.0	10.7	0.3

En el apéndice, en las tablas 73-75 se muestran los resultados obtenidos al cambiar de columna en las señales cromatográficas de los conservadores.

Al cambiar de columna se observa que el tiempo de retención del Clorhidrato de Bromhexina es de 10.7 minutos mientras que con la columna validada es de 12.5 minutos, también se observa que con la columna de prueba se colea mucho la señal de Clorhidrato de Bromhexina y los números de platos teóricos disminuyen. Los conservadores se resuelven más con la columna de prueba.

En la tabla 48 se muestran los % de recobro obtenidos en cápsulas al cambiar de columna.

Tabla 48.- % de recobro en cápsulas de 500mg/8mg al cambiar de columna

COLUMNA	Encontrado (%)		Estadística		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	Promedio	DES.EST.	%C.V.
1	91.03	91.87	91.4	0.6	0.7
2	87.09	87.61	87.4	0.4	0.4

Se observa que el % de recobro disminuye en la columna de prueba con respecto a la columna validada, esto no debería pasar ya que no se modificó nada en el proceso de tratamiento de la muestra, por lo que no se recomienda cambiar de columna.

En la tabla 49 se muestran los % de recobro en suspensiones de 250mg/8mg.

Tabla 49.- % de recobro en soluciones de Suspensión de 250mg/8mg al cambiar de columna

COLUMNA	Encontrado (%)		Estadística		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	Promedio	DES.EST.	C.V%
1	96.71	98.40	97.6	1.2	1.2
2	97.05	95.83	96.4	0.9	0.9

No se observan cambios tan drásticos en los por ciento de recobro en suspensiones de 250mg/8mg al cambiar de columna, sin embargo éstos valores disminuyen con la columna de prueba.

En la tabla 50 se muestran los % de recobro en suspensiones de 250mg/8mg.

Tabla 50.- % de recobro en soluciones de Suspensión de 500mg/8mg al cambiar de columna

COLUMNA	Encontrado (%)		Estadística		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	Promedio	DES.EST.	C.V%
A	100.62	98.55	99.6	1.5	1.5
B	98.18	100.22	99.2	1.4	1.5

No se observan cambios tan drásticos en los por ciento de recobro en suspensiones de 500mg/8mg al cambiar de columna.

En cuanto al % de recobro obtenido en cada producto se observa que estos no se modifican demasiado al cambiar de columna, varían más en las cápsulas.

No se recomienda cambiar de columna.

Hubiera sido interesante cambiar la columna validada por una más similar, ya que la que se utilizó es de diferente tamaño de partícula y diferente longitud y así observar como influyen estas características por separado en los parámetros cromatográficos de cada señal.

En las tablas 51 y 52 se muestran los resultados de tolerancia al modificar el pH a los valores mencionados en la página 31.

Tabla 51.- *Parámetro cromatográfico entre el Benzoato de sodio y el Metil-4-hidroxibenzoato*

Parámetro cromatográfico	Condición 1 (3.7)	Condición Normal (3.9)	Condición 2 (4.1)
Rs	2.4	2.5	3.2

Tabla 52.- *Parámetros cromatográficos del Clorhidrato de Bromhexina al cambiar de pH*

Parámetro cromatográfico	3.7	Normal (3.9)	4.1
T	0.5	1.06	1.4
Tr (min)	9.5	12.5	17.7
K'	7.3	9.3	13.5
C.V.	0.2	0.3	0.3

En el apéndice, en las tablas 76-78 se muestra la información de los parámetros cromatográficos de los conservadores y se observa que los parámetros cromatográficos de las señales de los conservadores casi no se modifican al variar el pH.

Se observa que al aumentar el pH aumenta la resolución entre el benzoato de sodio y el metil-4-hidroxibenzoato y al disminuir el pH la resolución entre dichos conservadores no varía demasiado.

En cuanto a la señal de Clorhidrato de Bromhexina se observa que al aumentar el pH aumenta el tiempo de retención considerablemente de 12.5 a 17.7 aumentando también el coe, ya que al retenerse más tiempo el Clorhidrato de Bromhexina el pico sale más ancho y menos alto, mientras que al disminuir el pH el tiempo de retención disminuye al igual que el coe.

El pH afecta considerablemente la señal de Clorhidrato de Bromhexina debido a que es un compuesto iónico.

En la tabla 53 se muestran los % de recobro de Clorhidrato de Bromhexina en los tres productos farmacéuticos.

Tabla 53.-% recobro de Clorhidrato de Bromhexina en los tres productos

pH	% recobro Clorhidrato de Bromhexina		
	Cápsulas 8 mg	Suspensión 250mg/8mg	Suspensión 500mg/8mg
Condición 1 (3.7)	103.9	95.8	98.8
Condición normal (3.9)	99.1	100.4	99.1
Condición 2 (4.1)	92.3	92.3	98.1

El Clorhidrato de Bromhexina se ve muy afectado por el cambio de pH debido a que es un compuesto iónico.

Por este motivo no se recomienda hacer cambios en el pH de la fase móvil.

3.2.10.- Límite de detección (L.D.)

En la tabla 54 se muestran los resultados obtenidos para esta prueba.

Tabla 54. - Limite de detección

CONCENTRACIÓN (mcg)	RESPUESTA
0.26	5.98
0.26	6.71
0.52	14.91
0.52	13.94
1.04	28.67
1.04	29.00
1.56	43.17
1.56	42.48
2.08	56.99
2.08	57.29
2.6	72.09
2.6	71.93

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Pendiente } (b_1) & = & 27.8 \\
 S_{yx} & & 0.48 \\
 \text{LD} = \frac{3.3 * S_{yx}}{b_1} & & 0.05649 \mu\text{g/mL} \\
 r^2 & = & 0.999644
 \end{array}$$

RESULTADO: 0.056µg/mL

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98.

Se cumple con el criterio de aceptación para esta prueba, ya que el coeficiente de determinación es mayor a 0.98.

3.2.11.- Límite de cuantificación (L.C.)

En la tabla 55 se observan los resultados de la prueba de límite de cuantificación.

Tabla 55.- Límite de cuantificación

CONCENTRACIÓN	RESPUESTA
0.26	5.98
0.26	6.71
0.52	14.91
0.52	13.94
1.04	28.67
1.04	29.00
1.56	43.17
1.56	42.48
2.08	56.99
2.08	57.29
2.6	72.09
2.6	71.93

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Pendiente } (b_1) & = & 27.8 \\
 S_{yx} & & 0.48 \\
 \text{LC} = \frac{10 * S_{yx}}{b_1} & & 0.17119 \mu\text{g/mL} \\
 r^2 & = & 0.999644
 \end{array}$$

RESULTADO: 0.171µg/mL

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Se prepararon 2 soluciones de Clorhidrato de Bromhexina a la concentración más cercana a la calculada como límite de cuantificación, que fue la de 0.182 µg/mL y se inyectaron 6 veces cada una, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 56-. Repetibilidad al inyectar soluciones estándar de 0.182 µg / mL

Inyección	Area (mAU*S)
1	5.36
1	5.49
1	5.35
1	5.47
1	5.40
1	5.298
2	5.29
2	5.25
2	5.175
2	5.30
2	5.32
2	5.197
Promedio	5.33
Des.est	0.098
C.V%	1.84%

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98. El coeficiente de variación de las áreas de las 6 inyecciones no debe ser mayor a 10%.

Se cumple con el criterio de aceptación para esta prueba.

Conclusiones

Se desarrolló un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución confiable, sencillo y selectivo para cuantificar Clorhidrato de Bromhexina en cápsulas y suspensiones, este método es capaz de identificar algunos conservadores como Benzoato de sodio, Metil-4-hidroxibenzoato y Propil-4-hidroxibenzoato. El tiempo de corrida aproximado de una inyección es de 14 minutos.

Este método puede ser de gran utilidad en la industria farmacéutica para realizar las pruebas de identidad de conservadores y principio activo así como la prueba de contenido de principio activo.

El método desarrollado cumple con los requerimientos de la Guía de Validación de métodos analíticos publicada por el Colegio Nacional de Químicos de farmacéuticos en el 2002.

Apéndice

En la figura 33 se muestra un cromatograma de fase móvil, donde no se observa ninguna señal.

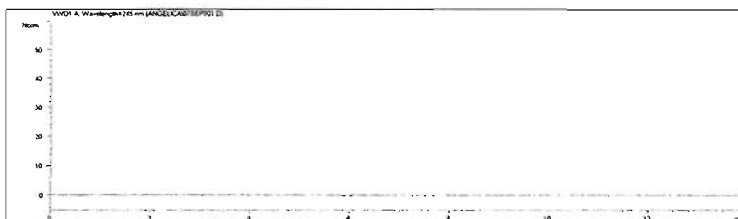


Figura 33.- Cromatograma blanco

- **Selectividad**

En las figura 34 se muestra un cromatograma representativo de la solución al 100% de Clorhidrato de Bromhexina.

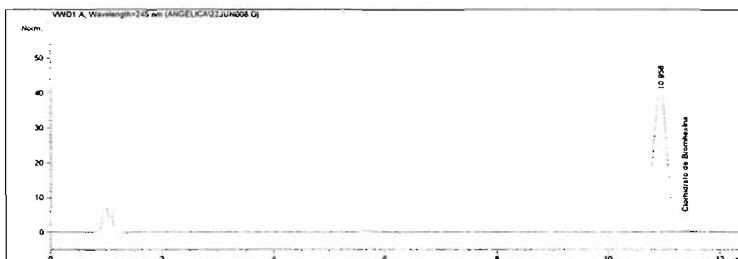


Figura 34.- Cromatograma solución de Clorhidrato de Bromhexina

En la figura 35 se muestra un cromatograma de la solución de Benzoato de sodio.

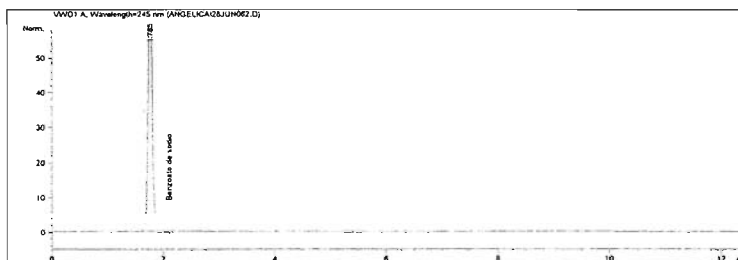


Figura 35.- Cromatograma de Solución de Benzoato de sodio

En la figura 36 se muestra un cromatograma de la solución de Metil-4-hidroxi-benzoato.

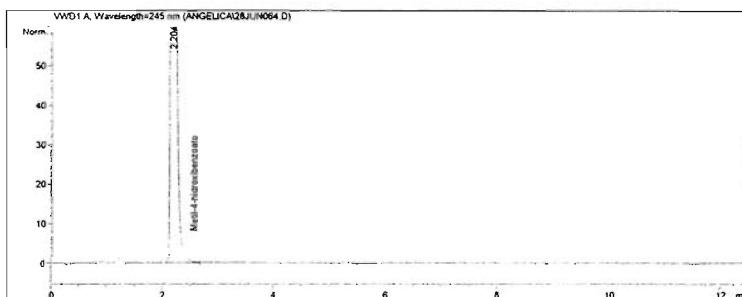


Figura 36.- Cromatograma solución de Metil-4-hidroxi-benzoato

En la figura 37 se muestra el cromatograma de la solución de Propil-4-hidroxi-benzoato.

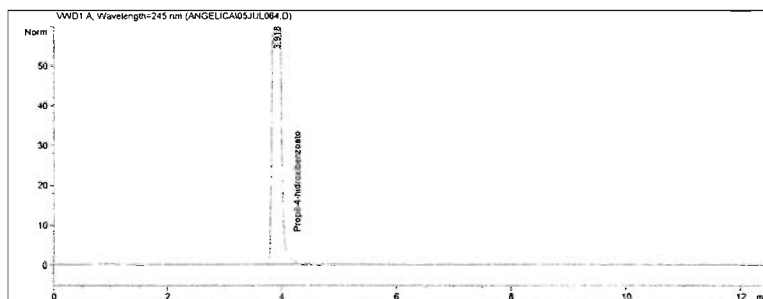


Figura 37.- Cromatograma de solución de Propil-4-hidroxi-benzoato

En la figura 38 se muestra un cromatograma de la solución de placebo de cápsulas con ampicilina.



Figura 38.- Cromatograma placebo cápsulas + ampicilina

En la figura 39 se muestra un cromatograma de la solución de placebo de suspensiones con ampicilina.

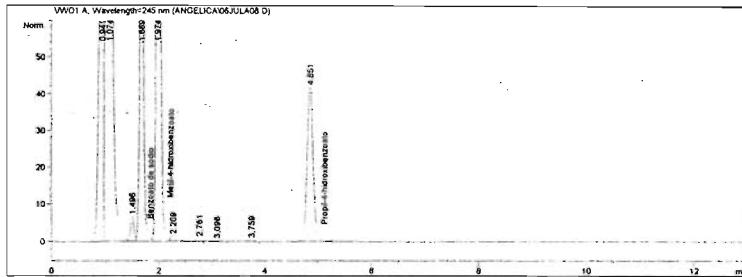


Figura 39.- Cromatograma placebo suspensión de 500 mg / 8 mg + ampicilina

- a. Los cromatogramas representativos de las soluciones que se sometieron a degradación por calentamiento a los 15 días de análisis son los siguientes.

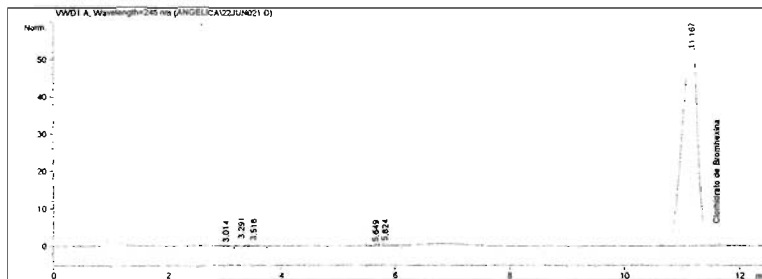


Figura 40.- Cromatograma Solución de Clorhidrato de Bromhexina que se calentó (15 días)

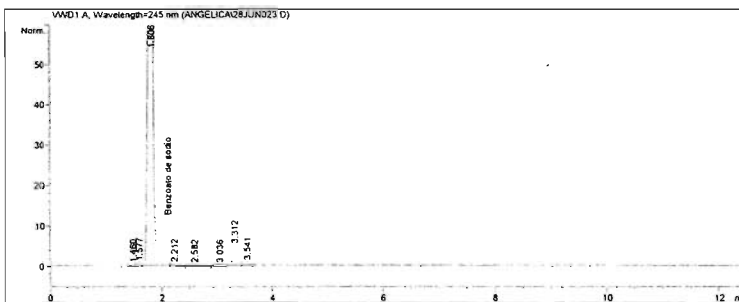


Figura 41.- Cromatograma de Solución de Benzoato de sodio que se calentó (15 días)

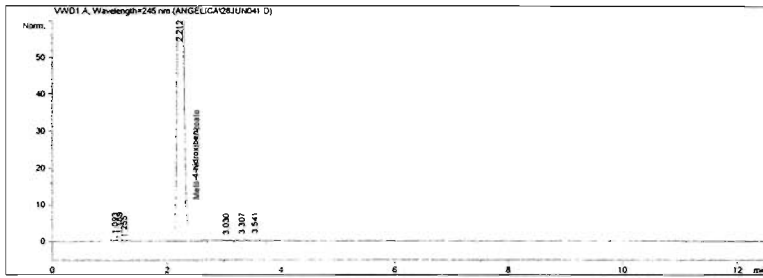


Figura 42.- Cromatograma de solución de Metil-4-hidroxibenzoato que se calentó (15 días)

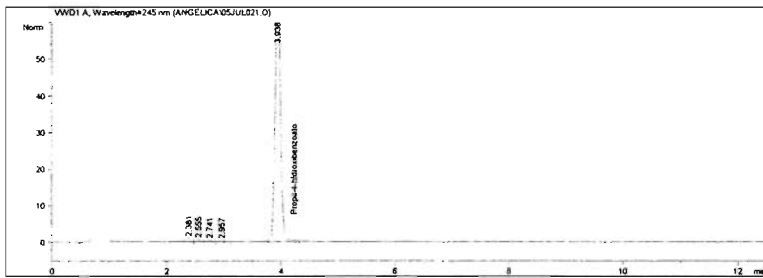


Figura 43.- Cromatograma de solución de Propil-4-hidroxibenzoato que se calentó (15 días)

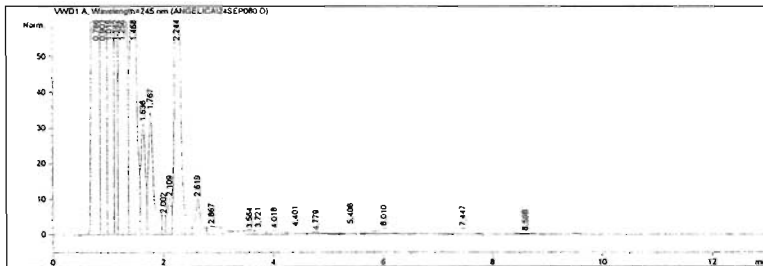


Figura 44.- Cromatograma de solución de Ampicilina que se calentó (15 días)

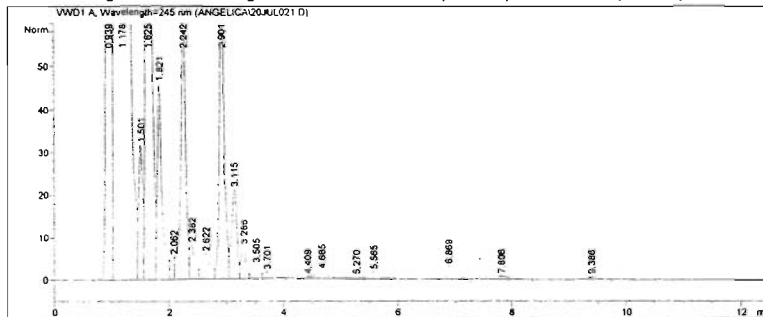


Figura 45.- Cromatograma de solución de placebo de cápsulas que se calentó (15 días)

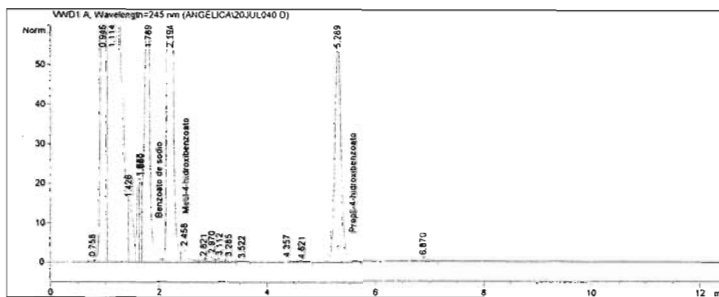


Figura 46. - Cromatograma de solución de placebo de suspensión que se calentó (15 días)

- b. Los cromatogramas representativos de las soluciones que se sometieron a degradación por hidrólisis ácida son los siguientes.

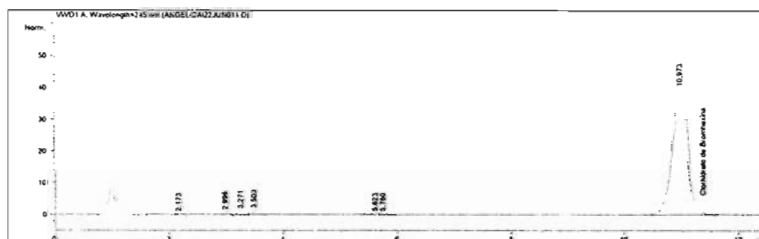


Figura 47. - Cromatograma Solución de Clorhidrato de Bromhexina con HCl 1 N (15 días)



Figura 48. - Cromatograma de Solución de Benzoato de sodio con HCl 1N (15 días)

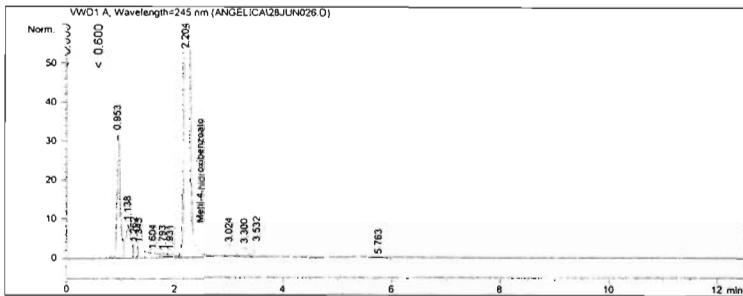


Figura 49.- Cromatograma de solución de Metil-4-hidrobenzoato con HCl 1N (15 días)

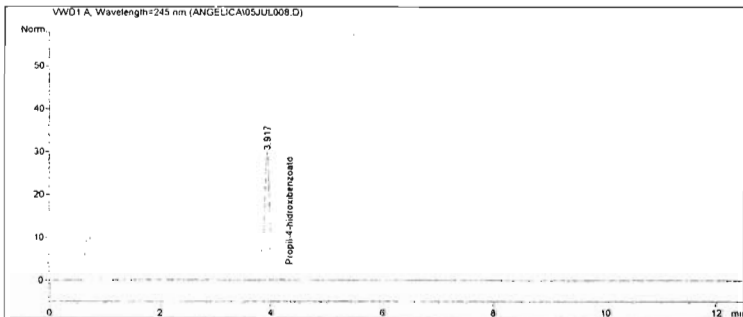


Figura 50.- Cromatograma de solución de Propil-4-hidrobenzoato con HCl 1N (15 días)

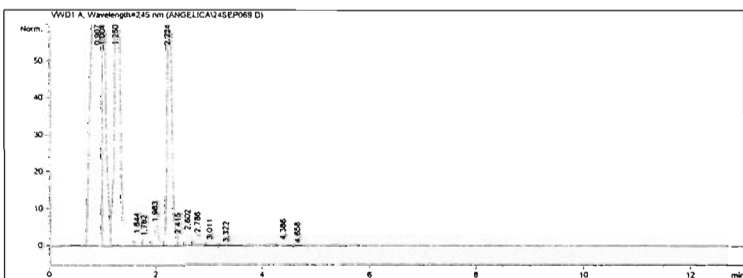


Figura 51.- Cromatograma de solución de Ampicilina con HCl 1N (15 días)

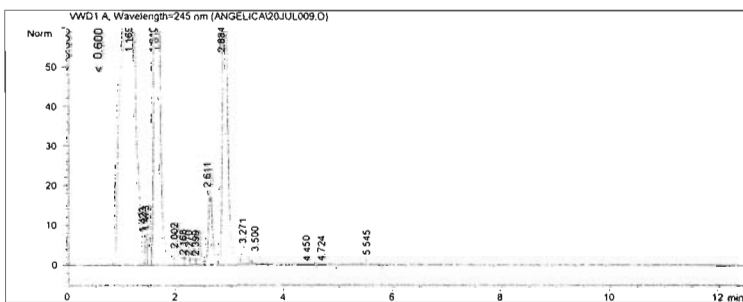


Figura 52.- Cromatograma de solución de placebo de cápsulas con HCl 1N (15 días)

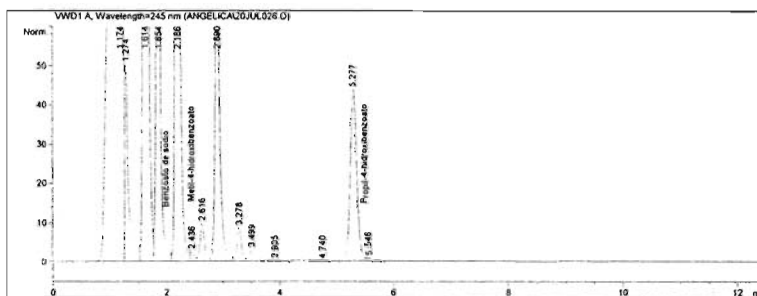


Figura 53.- Cromatograma de solución de placebo de suspensión con HCl 1N (15 días)

- c. Los cromatogramas representativos de las soluciones que se sometieron a degradación por hidrólisis básica son los siguientes.

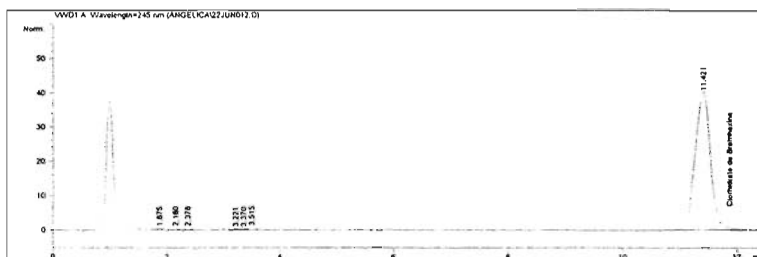


Figura 54.- Cromatograma Solución de Clorhidrato de Bromhexina con NaOH 1 N (15 días)

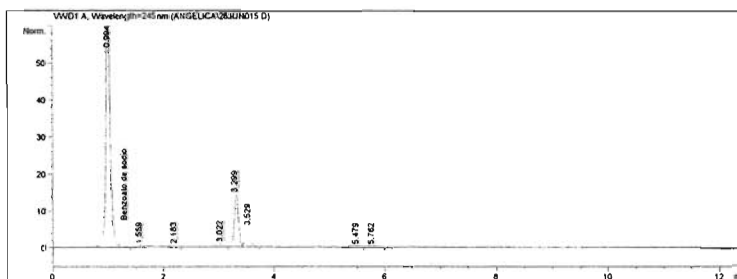


Figura 55.- Cromatograma de Solución de Benzoato de sodio con NaOH 1N (15 días)

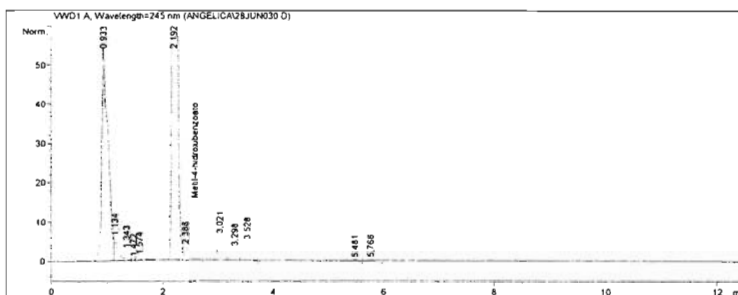


Figura 56.- Cromatograma de solución de Metil-4-hidroxibenzoato con NaOH 1N (15 días)

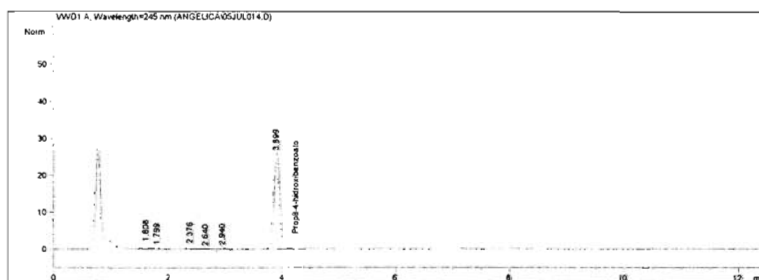


Figura 57.- Cromatograma de solución de Propil-4-hidroxibenzoato con NaOH 1N (15 días)

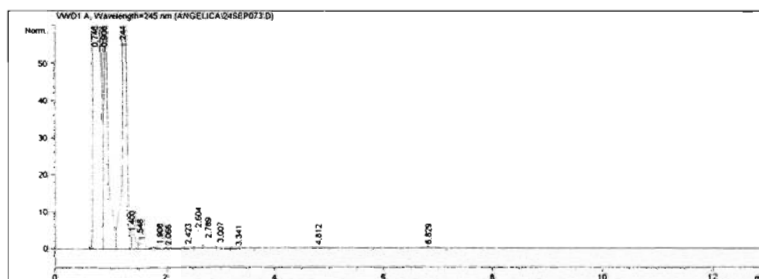


Figura 58.- Cromatograma de solución de Ampicilina con NaOH 1N (15 días)

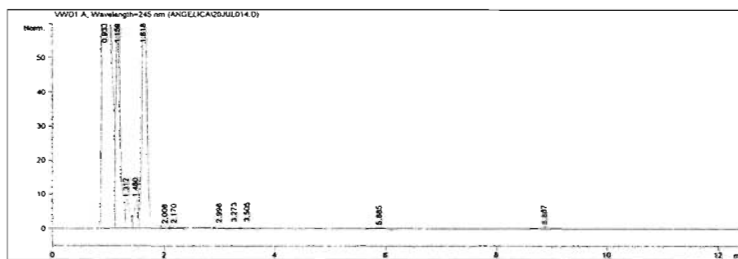


Figura 59.- Cromatograma de solución de placebo de cápsulas con NaOH 1N (15 días)

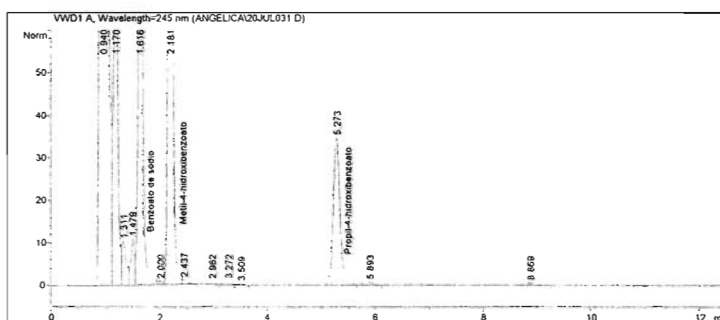


Figura 60.- Cromatograma de solución de placebo de suspensión con NaOH 1N (15 días)

- d. Los cromatogramas representativos de las soluciones que se sometieron a oxidación son los siguientes.

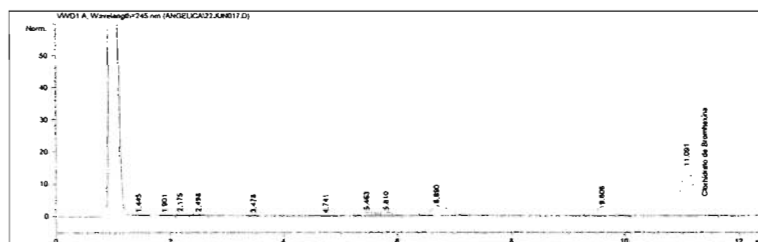


Figura 61.- Cromatograma Solución de Clorhidrato de Bromhexina con H₂O₂ (15 días)

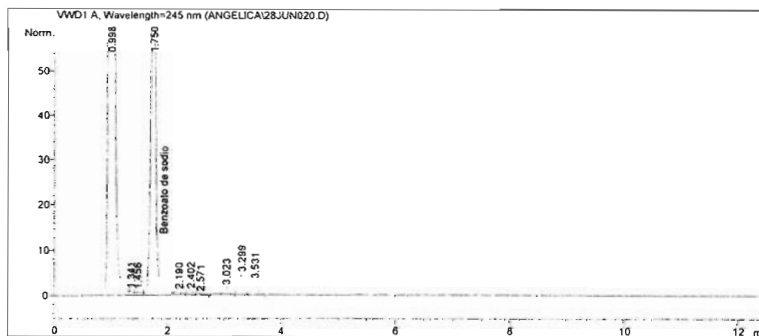


Figura 62.- Cromatograma de Solución de Benzoato de sodio con H_2O_2 (15 días)

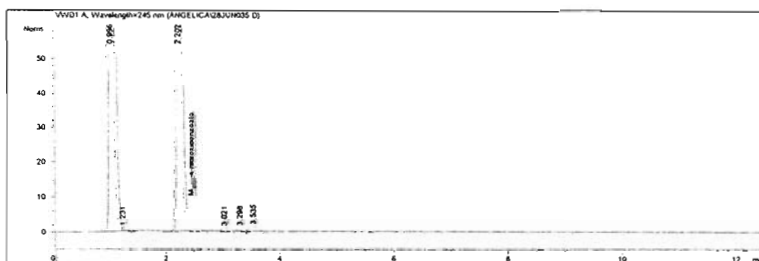


Figura 63.- Cromatograma de solución de Metil-4-hidroxibenzoato con H_2O_2 (15 días)

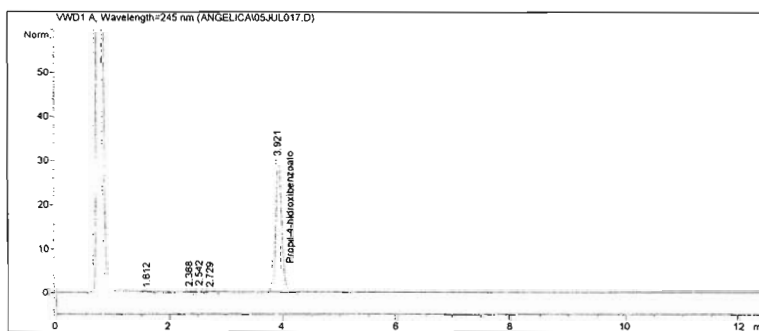


Figura 64.- Cromatograma de solución de Propil-4-hidroxibenzoato con H_2O_2 (15 días)

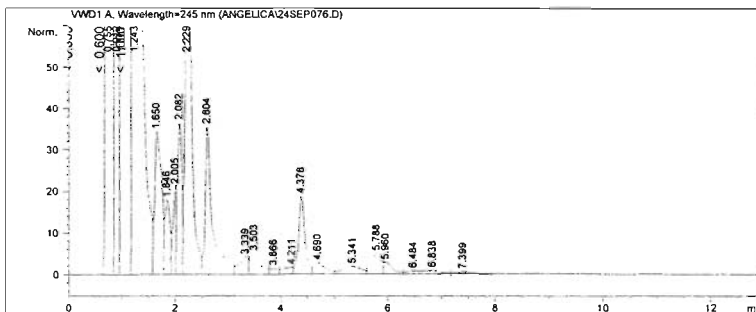


Figura 65.- Cromatograma de solución de Ampicilina con H₂O₂ (15 días)

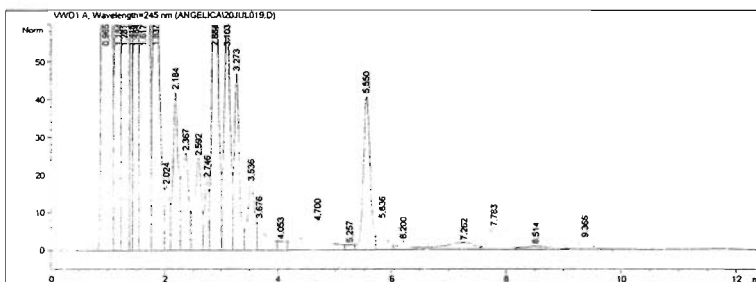


Figura 66.- Cromatograma de solución de placebo de cápsulas con H₂O₂ (15 días)

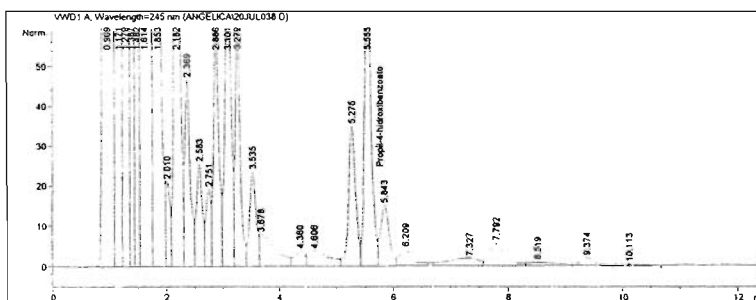


Figura 67.- Cromatograma de solución de placebo de suspensión con H₂O₂ (15 días)

- Estabilidad de fase móvil

En las siguientes tablas se muestran los resultados de estabilidad de fase móvil de las señales de los conservadores.

Tabla 57.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio en fase móvil a temperatura ambiente

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
DÍAS	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V. (%)	0.4602	0.3074
Área Promedio	397.3	399.0
Tiempo de retención	1.3354	1.3459
No. Platos teóricos	1253.5	1540.30
Coleo	1.98	1.686
Factor de capacidad	0.3	0.330
Resolución	--	--

Tabla 59.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil a temperatura ambiente

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
DÍAS	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V. (%)	0.3642	0.5334
Área Promedio	1149.2	1164.9
Tiempo de retención	1.6526	1.6587
No. Platos teóricos	4282.7	4109.50
Coleo	0.77	0.75
Factor de capacidad	0.6	0.630
Resolución	2.51	2.6

Tabla 61.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato en fase móvil a temperatura ambiente

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
DÍAS	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V. (%)	/	/
Área Promedio	213.5	226.4
Tiempo de retención	4.09	4.07
No. Platos teóricos	8361.73	8134.70
Coleo	0.82	0.82
Factor de capacidad	2.7	3.010
Resolución	17.16	16.97

Tabla 58.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio en fase móvil en refrigeración

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
DÍAS	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V. (%)	0.4602	0.5448
Área Promedio	397.3	401.2
Tiempo de retención	1.3354	1.3414
No. Platos teóricos	1253.5	1455.4
Coleo	1.98	1.99
Factor de capacidad	0.3	0.320
Resolución	--	--

Tabla 60.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato en fase móvil en refrigeración

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
DÍAS	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V. (%)	0.3642	0.6236
Área Promedio	1149.2	1166.2
Tiempo de retención	1.6526	1.6584
No. Platos teóricos	4282.7	4111.00
Coleo	0.77	0.75
Factor de capacidad	0.6	0.630
Resolución	2.51	2.6

Tabla 62.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato en fase móvil en refrigeración

PARÁMETRO	TIEMPO (días)	
	0	7
DÍAS	0	7
Flujo (mL/min)	1.2	1.2
C.V. (%)	/	/
Área Promedio	213.5	225.7
Tiempo de retención	4.09	4.07
No. Platos teóricos	8361.73	8136.54
Coleo	0.82	0.81
Factor de capacidad	2.7	2.980
Resolución	17.16	16.96

- Tolerancia

En las siguientes tablas se muestran los resultados de la prueba de tolerancia al cambiar la polaridad de la fase móvil para los conservadores.

Tabla 63.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio al variar la proporción de la fase móvil

Parámetro cromatográfico	5 % menos de Acetonitrilo	Normal	5 % más de Acetonitrilo
Área promedio	516.7	484.5	480.8
Tr (min)	1.8	1.6	1.5
T	1.25	1.3	1.2
K'	0.5	0.3	0.2
R	/	/	/
N	2185	1630	1946
C.V.%	0.6	0.3	0.9

Tabla 64.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato al variar la proporción de la fase móvil

Parámetro cromatográfico	5 % menos de Acetonitrilo	Normal	5 % más de Acetonitrilo
Área promedio	1381.0	1412.9	1378.0
Tr (min)	2.24	1.9	1.78
T	0.76	0.73	0.75
K'	0.5	0.6	0.8
R	3.4	2.5	2.2
N	5614	4690	4593
C.V.%	0.6	0.3	1.0

Tabla 65.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato al variar la proporción de la fase móvil

Parámetro cromatográfico	5 % menos de Acetonitrilo	Normal	5 % más de Acetonitrilo
Área promedio	272.2	266.3	272.4
Tr (min)	6.3	4.5	3.9
T	0.84	0.79	0.80
K'	2.2	2.7	4.2
R	21.9	17.2	15.1
N	10058	8786	8255
C.V.	0.7	2.0	0.2

En las tablas siguientes se muestran los resultados de tolerancia al cambiar de columna para las señales de los conservadores.

Tabla 66.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio al cambiar de columna

COLUMNA	NPT	Factor de coleo	Factor de capacidad	Tiempo de retención	C.V (%) Solución de referencia
1	1630.0	1.3	0.3	1.6	0.3
2	1914.5	1.8	0.9	2.0	0.4

Tabla 67.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato al cambiar de columna

COLUMNA	NPT	Factor de coleo	Factor de capacidad	Tiempo de retención	C.V (%) Solución de referencia
1	4690.4	0.7	0.6	1.9	0.3
2	7414.4	1.0	1.4	2.5	0.4

Tabla 68.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato al cambiar de columna

COLUMNA	NPT	Factor de coleo	Factor de capacidad	Tiempo de retención	C.V (%) Solución de referencia
1	8785.9	0.8	2.7	4.5	2.0
2	10854.5	1.3	4.8	6.2	2.8

En las tablas siguientes se muestran los resultados de tolerancia al cambiar el pH para las señales de los conservadores.

Tabla69.- Parámetros cromatográficos del Benzoato de sodio al cambiar el pH

Parámetro cromatográfico	Condición 1 (3.7)	Condición Normal (3.9)	Condición 2 (4.1)
T	0.6	1.3	--
Tr (min)	1.7	1.6	--
K'	0.5	0.3	--
C.V.	0.55	0.3	--

No hay valores a pH de 4.1 para el benzoato de sodio, ya que el pico salió dobleteado.

Tabla 70.- Parámetros cromatográficos del Metil-4-hidroxibenzoato al cambiar el pH

Parámetro cromatográfico	Condición 1 (3.7)	Condición Normal (3.9)	Condición 2 (4.1)
T	0.75	0.73	0.75
Tr (min)	1.95	1.9	1.97
K'	0.7	0.6	0.6
C.V.	1.2	0.3	0.3

Tabla 71.- Parámetros cromatográficos del Propil-4-hidroxibenzoato al cambiar el pH

Parámetro cromatográfico	Condición 1 (3.7)	Condición Normal (3.9)	Condición 2 (4.1)
T	0.81	0.79	0.81
Tr (min)	4.7	4.5	4.8
K'	3.11	2.7	2.95
C.V.	0.6	2.0	0.3

Bibliografía

- 1) *European Pharmacopoeia*, 3^a Edición., Council of Europe., Strasbourg cedex., 1996.
- 2) *British Pharmacopoeia Volumen I*, United Kingdom., 1993., pp. 87.
- 3) *The Merck Index*, 13^{va} Edición., Merck & Co. Inc., U.S.A., 2001., pp 1411.
- 4) Rauha., Salomies., Aalto., *Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and methyl and propyl p-hydroxybenzoate and determination of dextromethorphan hydrobromide in cough-cold syrup by high-performance liquid chromatography*., Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis., 15 (1996)., 287-293.
- 5) Gober B. et al., *Zur stabilität von bromhexin und zur striktur seiner abbauprodukte*., Pharmazie., 1988., 43:23-26.
- 6) Prescripción de Análisis No. PF 302972., Bisolvon Ampicilina., 1979.
- 7) *Diccionario de Especialidades farmacéuticas*., Edición 48., Ediciones PLM S.A. de C.V., México., 2002., pp 304.
- 8) <http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa>.
- 9) Prado F., Covarrubias H., *Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución*., Comité Editorial UAM., México D.F., 1996.
- 10) Bidlingmeyer B., *Practical HPLC Methodology and applications*., John Wiley & Sons. Inc., U.S.A., 1992.
- 11) Journal of Chromatography library., vol 51 A., *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods part A: Fundamentals and techniques*., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam., 1992.
- 12) Pungor E., *A Practical Guide to Instrumental Analysis*., CRC Press, Inc., U.S.A., 1995.
- 13) Snyder L., *Introduction to modern liquid Chromatography*., John Wiley & Sons. Inc., U.S.A., 1979.

- 14) Meyer V., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons. Ltd., Frankfurt., 1988.
- 15) Janak J., *Liquid Column Chromatography*, Elsevier Scientific Publishing Company., Amsterdam., 1975.
- 16) Lough W., *High Performance Liquid Chromatography, Fundamentals Principles and Practice*, Chapman & Hall., 1996.
- 17) Settle F., *Handbook of Instrumental techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall., 1997., pp. 147-164.
- 18) Hernández L., *Introducción al análisis instrumental*, Editorial Ariel., España 2002.
- 19) Montgomery D., *Diseño y análisis de experimentos*, Grupo Editorial Iberoamérica., México., 1991.
- 20) Comisión de validación de métodos analíticos., *MÉTODOS ANALÍTICOS GUÍA DE VALIDACIÓN*, Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos biólogos México A.C., 2002.
- 21) *PNO para validar y reportar métodos analíticos*, BI Promeco., 2002.
- 22) *Validation of analytical procedure: methodology*, Tripartite International Conference on Harmonisation (ICH) Text., London., 6 November 1996.
- 23) *The United States Pharmacopeia*, USP 24, NF 19, 2000.
- 24) *FDA Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation*, <http://www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.htm>.
- 25) *NOM-059-SSAI-1993- Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos*, <http://www.ssa.gob.mx>.
- 26) *NOM-073-SSAI-1993- Estabilidad de medicamentos*, <http://www.ssa.gob.mx>.