

66
240



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR BENZOCAINA, HIDROCORTISONA Y CLORAMFENICOL EN SOLUCION OTICA, POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION”

TESIS

HECTOR GUTIERREZ GUTIERREZ

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1991

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	3
2.1 Cromatografía	3
2.2 Estándar interno	17
2.3 Validación de métodos analíticos	18
2.4 Hidrocortisona	25
2.5 Cloramfenicol	28
2.6 Benzocaína	31
3. DESARROLLO DEL METODO	34
3.1 Elección de la longitud de onda	34
3.2 Elección de la columna	35
3.3 Selección de la fase móvil	35
3.4 Parte experimental	35
3.5 Método de análisis a validar	50
4. RESULTADOS DE LA VALIDACION	52
4.1 Linearidad del sistema	53
4.2 Repetibilidad del sistema	59
4.3 Linearidad del método	62

	<u>Página</u>
4.4 Especificidad	68
4.5 Exactitud y repetibilidad del método .	71
4.6 Reproducibilidad del método	74
5. CONCLUSIONES	77
6. BIBLIOGRAFIA	78

1. INTRODUCCION

Para la valoración de benzocaina, hidrocortisona y cloramfenicol en una solución óptica, la metodología de análisis de la empresa fabricante establece un método analítico diferente para cada uno de los principios activos, sin previa separación, utilizando una propiedad química característica en cada uno de ellos. (1)

El desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución tiene como objetivo el cuantificar en forma simultánea los tres principios activos mencionados, bajo las mismas condiciones de análisis, aprovechando una propiedad característica en los tres compuestos a valorar: la absorbancia en el intervalo de luz ultravioleta. (2)

BENZOCAINA.- Máximo a 278 nm.

CLORAMFENICOL.- Máximo a 278 nm.

HIDROCORTISONA.- Máximo a 242 nm.

El análisis de los tres principios activos por este método permite obtener resultados con mayor rapidez, principalmente en el caso del análisis del cloramfenicol que por usar un método microbiológico, los resultados se obtienen 72 horas después.

El desarrollo del método por cromatografía de líquidos contempla el uso de un estándar interno para optimizar la exactitud y precisión del análisis.

La validación del método analítico nos permitirá determinar su exactitud y establecer su variabilidad para la absoluta confiabilidad.

2. GENERALIDADES.

2.1 CROMATOGRAFIA.

2.1.1 DEFINICION

Cualquier tipo de cromatografía puede definirse como un proceso de migración diferencial, en donde los componentes de la muestra son retenidos selectivamente por una fase estacionaria (por efecto de repetidas etapas de adsorción y desorción, o por los diferentes coeficientes de distribución de los componentes de la muestra).⁽³⁾

El sistema de cromatografía cuenta con dos fases: fase estacionaria y fase móvil.

En la cromatografía de líquidos, la fase estacionaria, con una gran superficie de contacto, puede ser un sólido activo o un líquido inmóvil. La fase móvil siempre será un líquido, el cual pasará a través del material estacionario.

2.1.2 CLASIFICACION DE LA CROMATOGRAFIA.

De acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria, la cromatografía puede dividirse según la figura No. 1.

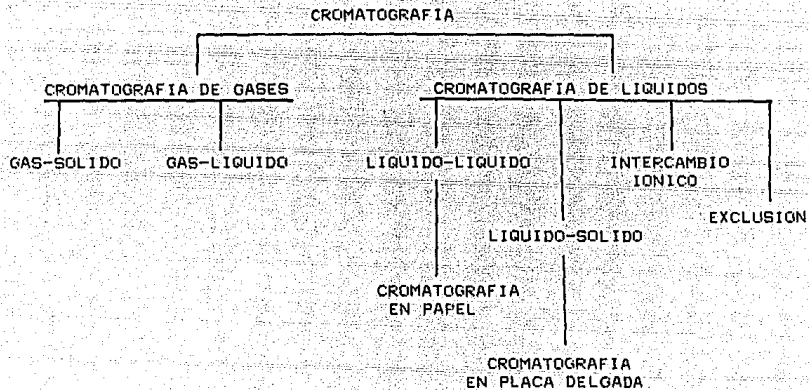


Fig. 1 Esquema de los diferentes tipos de cromatografía. (3)

2.1.3 METODOS EN CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS. ⁽³⁾

Existen 4 mecanismos diferentes para la retención de las moléculas de la muestra por la fase estacionaria, éstos son:

- Cromatografía líquido-líquido (LLC).
- Cromatografía líquido-sólido (LSC).
- Cromatografía de intercambio iónico (IEC).
- cromatografía de permeación en gel (GPC).

a) Cromatografía líquido-líquido.

Comunmente conocida como cromatografía de partición, involucra una fase estacionaria líquida cuya composición es diferente a la fase móvil líquida. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria, al igual que en una extracción líquido-líquido en un embudo de separación. La fase móvil y la fase estacionaria deben ser inmiscibles.

Inicialmente la fase estacionaria líquida se encontraba unida mecánicamente a un soporte sólido, pero con frecuencia sufría el arrastre por parte de la fase móvil, para evitar este inconveniente se creó una nueva técnica: cromatografía de fase enlazada, en la cual la fase estacionaria está permanentemente unida al soporte por enlaces químicos. Una gran variedad de materiales se pueden unir al soporte para obtener diferentes grados de polaridad en la fase estacionaria.

b) Cromatografía líquido-sólido.

También conocida como cromatografía de adsorción. En el empaque encontramos partículas con grandes áreas de contacto que retienen a las moléculas de la muestra por atracción (afinidad cromatográfica). Los materiales usados generalmente en la fase estacionaria son: alúmina, carbón activado y carbonato de calcio. Normalmente la cromatografía de adsorción separa los compuestos por grupos funcionales de acuerdo a la polaridad, a través de etapas de adsorción-desorción.

c) Cromatografía de permeación en gel.

En esta técnica denominada también como cromatografía por exclusión, la separación de los componentes de la muestra se realiza de acuerdo al tamaño de las moléculas, las más pequeñas penetrarán en la mayoría de los poros de la fase estacionaria, por lo tanto serán retenidas mayor tiempo que las moléculas grandes, las cuales pasarán libremente a través de la columna que por su tamaño no penetrarán en los poros. Los materiales usados como relleno en la fase estacionaria son geles poliméricos rígidos, con un tamaño de poro controlado.

El tiempo de retención de cada compuesto estará en relación inversa a su peso molecular; menor tiempo de retención para compuestos con mayor peso molecular.

d) Cromatografía de intercambio iónico.

En la fase estacionaria se encuentran fijados grupos iónicos en compañía de contraiones (aniones y cationes), que permiten separar los componentes de una muestra que presente o logre poseer carga iónica, como aminoácidos, sales, compuestos anfotéricos etc.

La capacidad de la columna estará definida como el número de grupos funcionales para el intercambio iónico, y es expresado como miliequivalente/gramo de resina en forma de anión o de catión.

Una variante de esta técnica es la cromatografía por par iónico, al adicionar un segundo ión al eluyente para combinarse con los iones de la muestra para formar el par iónico neutro, y posteriormente separarse en la columna de fase inversa.

2.1.4 DISOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.

El diseño para una separación óptima en la cromatografía de líquidos depende de usar la fase móvil adecuada para la columna y muestra establecidas, Deben considerarse diversas propiedades del disolvente como polaridad, fuerzas de dispersión, momento dipolo y enlaces hidrógeno.

Puesto que existe una gran variedad de posibles disolventes para la selección de nuestra fase móvil requerimos de una clasificación de ellos de acuerdo con sus propiedades relevantes.

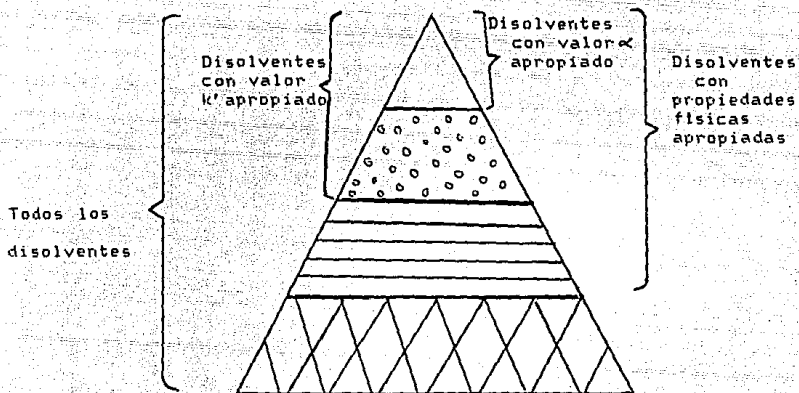


Fig. 2 Clasificación de disolventes para cromatografía de líquidos.

De acuerdo con la figura No. 2, para seleccionar la fase móvil en cromatografía de líquidos, primero eliminaremos los disolventes con propiedades físicas (punto de ebullición, viscosidad, absorbancia al UV, etc.), inapropiadas para su uso.

En seguida se seleccionará el disolvente o mezcla de disolventes con la adecuada fuerza cromatográfica (polaridad), para eluir una muestra de un adsorbente.

Por último la elección de los disolventes se efectúa de acuerdo al agrupamiento entre ellos, basados en sus propiedades de momento dipolo, enlaces hidrógeno y fuerzas de dispersión.

Dentro de las principales características que debe reunir la fase móvil están las siguientes: ⁽⁴⁾

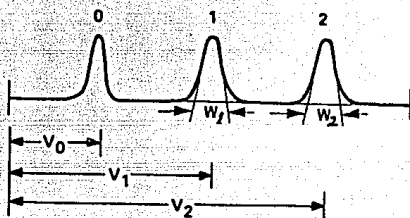
- No alterar las características de la columna.
- Ser compatible con el detector.
- Disolver la muestra.
- Tener un valor bajo de viscosidad.
- Pureza óptima, no tener contaminantes.
- Disponibilidad en el mercado a precio razonable.

2.1.5 PARAMETROS FUNDAMENTALES EN CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.

RESOLUCION.

El objetivo fundamental en la cromatografía de líquidos es obtener una separación adecuada de los componentes de una muestra.

Resolución (R) es el grado de separación entre dos picos, según figura No. 3. (4)



$$R = \frac{v_2 - v_1}{1/2 (w_1 + w_2)}$$

Figura No. 3.

Los parámetros que determinan el grado de separación de cada uno de los componentes de la muestra, constituyen la siguiente ecuación.

$$R = \frac{1}{2} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\sqrt{N} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)$$

SELECTIVIDAD
EFICIENCIA
FACTOR DE CAPACIDAD

a) Selectividad (α).

Mide la habilidad de una columna para separar dos componentes debido a sus diferentes afinidades y por tanto a su diferente retención. La separación de los componentes requiere

que tengan diferentes coeficientes de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria ($\alpha \neq 1$). (5)

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

b) Factor de capacidad (k').

Es una medida de la retención de un componente ($k' \neq 0$), y se define como la relación del número de moles del componente X en la fase estacionaria (S_{st}), entre el número de moles del componente X en la fase móvil (S_m). (5)

El factor de capacidad (k') para un componente dado está definido en la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

c) Eficiencia (N).

Describe el grado de anchura del pico en el sistema cromatográfico, y un cambio en la eficiencia de la columna afecta a la resolución.

$$N = 16 \left(\frac{V_1}{W_1} \right)^2$$

N es un valor útil para medir la habilidad relativa de la columna para proporcionar picos angostos, es decir con valores pequeños para W, y así mejorar la resolución.

2.1.6 EQUIPO.

Normalmente un cromatógrafo de líquidos cuenta con los componentes que se representan en la figura No. 4.

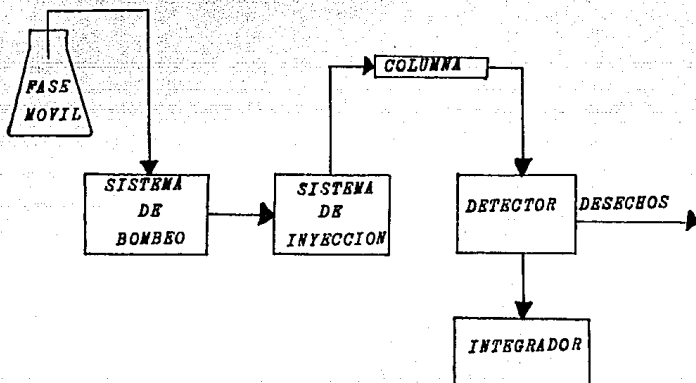


Fig. No. 4 Componentes de un sistema típico de Cromatografía de Líquidos. (4)

a) Sistema de bombeo. (6)

En la actualidad existe una gran variedad de equipo para bombeo en la cromatografía de líquidos, cuya función es la de mover el disolvente a través del sistema cromatográfico. El equipo debe trabajar a presiones altas, normalmente mayores de

500 PSI para vencer la resistencia que opone el empaque de la columna. Existen dos tipos de sistema de bombeo:

I) Bombas de presión constante.

Para el funcionamiento de estas bombas se requiere del uso de un gas inerte, entre los inconvenientes de éstos sistemas están: la presión de trabajo está limitada hasta 1000 PSI y por lo tanto la capacidad de volumen a bombear también está restringida, también puede presentarse la difusión del gas en la fase móvil, aunque este problema puede resolverse al utilizar alguna interfase entre el gas y el líquido.

II) Bombas de flujo constante.

Estas bombas son adecuadas para disminuir los cambios en el flujo debido a variables no controladas. El flujo de volumen que desplazan es constante aunque no en forma continua, sino en forma pulsante, esto puede ser un inconveniente porque se reduce la eficacia de la columna y crea inestabilidad en el detector. Para eliminar o disminuir éstas desventajas es necesario el uso de un sistema amortiguador.

b) Modulo de inyección.

Esta sección del equipo se construye con materiales resistentes e inertes como el teflón y el acero inoxidable, está diseñado de acuerdo con las características que deben estar presentes en el inyector, como son: resistir altas presiones, la

muestra debe ser arrastrada completamente por la fase móvil y contener un volumen pequeño.

El módulo de inyección cuenta con una porción de tubo capilar para recibir el volumen de muestra por medio de una jeringa. La capacidad del tubo está definida; la inyección de la muestra puede ser de un volumen igual o menor a la capacidad del inyector. A pesar de tener altas presiones en el interior del sistema, la muestra se puede introducir mediante una jeringa cerrando la cámara de inyección al paso de la fase móvil mediante una válvula, la cual desvía a la fase móvil por otro camino.

c) Detector. (7)

Otro componente básico en la cromatografía de líquidos y de gran importancia de acuerdo con las características que debe poseer para responder a situaciones como: variaciones de flujo, fluctuaciones en el interior del sistema de bombeo, gradientes de temperatura etc..

El detector mide en forma continua alguna propiedad físico química de los componentes de una muestra o de la solución que los contiene y genera una señal proporcional a la concentración de los componentes, a medida que dicha muestra es separada de la columna.

Un detector óptimo debe contar con las siguientes propiedades:

- Ser altamente sensible y tener la misma respuesta predecible

- Responder a todos los solutos o tener una especificidad predecible.
- Tener una respuesta que se incremente en forma lineal con la cantidad de soluto.
- Tener un amplio intervalo de linealidad.
- Ser estable en cuanto a variaciones de temperatura y de flujo de la fase móvil.
- No contribuir al ensanchamiento de los picos.
- No debe destruir al soluto.
- Presentar confiabilidad en el uso.
- Presentar información cualitativa en la detección de un pico.
- Presentar respuesta rápida.

Los detectores usados en cromatografía de líquidos se dividen en dos tipos.

I) Detectores generales: Miden un cambio en una propiedad física del soluto y de la fase móvil en conjunto, ejemplo: índice de refracción.

II) Detectores selectivos: Son sensibles solamente a alguna propiedad del soluto, ejemplo: absorción ultravioleta.

d) Integrador. (7)

El integrador es el componente que transforma de alguna manera la intensidad de las señales emitidas por el detector, en números digitales que puedan relacionarse con la cantidad de muestra.

Entre las funciones primarias que debe ejecutar un buen integrador, están las siguientes:

- Convertir las señales recibidas del detector en medidas que estén relacionadas con la cantidad de la muestra.
- Reconocer picos cromatográficos.
- Determinar el inicio, final y tiempo de retención de un pico
- Calcular la cantidad de cada componente detectado.
- Efectuar correcciones por línea base.
- Mantener la información de los picos en la memoria.
- Imprimir los resultados.

Las tres primeras funciones se realizan durante el transcurso de la corrida.

e) Columnas.⁽⁶⁾

La columna es el corazón de la cromatografía, puesto que en ella se efectúa la separación de los componentes de la muestra. Alcanzar el óptimo método de análisis por cromatografía de líquidos, depende de seleccionar la columna adecuada. De acuerdo con su uso pueden dividirse en:

1) Columnas analíticas.

Normalmente son tubos cilíndricos de un material inerte, capaz de resistir altas presiones. El material más usado es el acero inoxidable, también se emplea el tubo de vidrio, pero las conexiones metal-vidrio a altas presiones no sellan herméticamente. El diámetro interno de las columnas varía entre 1 y 6

mm, en la mayoría de los casos es de 3 a 4 mm. La longitud varía de 7 a 50 cm, en algunos casos, sobre todo en el método de permeación en gel suelen ser de mayor longitud. Este tipo de columnas se utilizan en los métodos analíticos. Generalmente las columnas de mayor eficacia son de diámetro pequeño (3 mm) y efectúan análisis muy rápido.

II) Columnas preparativas.

Empleadas para separar y recuperar los componentes de una muestra en cantidad suficiente para su uso posterior, éstas columnas pueden tener más de 1 cm de diámetro interno. La separación se realiza en forma más lenta con una eficiencia menor que las columnas de diámetro menor.

2.2 ESTANDAR INTERNO.

Los errores de un método analítico provenientes del equipo y del procedimiento pueden ser reducidos mediante el uso de un estándar interno. Las características que debe poseer el estándar interno para ser utilizado en un método por cromatografía de líquidos, son las siguientes: ⁽³⁾

- Eluir cerca de los picos de interés.
- Ser químicamente inerte.
- Tener completa resolución, no interferir con algún pico.
- Su concentración debe ser similar a las concentraciones de los picos de interés.
- No formar parte de la muestra.

Para compensar los errores producidos durante la preparación de las muestras, el estándar interno se adicionará antes del proceso cromatográfico.

2.3 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

La validación tiene como objetivo el certificar la validez de los métodos de análisis empleados rutinariamente, para su absoluta confiabilidad, y consiste en determinar a través de estudios de laboratorio la exactitud y establecer la precisión con la cual se cuantifica el (los) principio(s) activo(s) contenidos en una formulación. ⁽⁹⁾

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

2.3.1 LINEARIDAD.

Es la medida del grado en el cual la curva de calibración del método se aproxima a la linealidad, para asegurar que el resultado obtenido es proporcional a la concentración del principio activo a evaluar, dentro de un intervalo de concentraciones definido. ⁽⁹⁾

a) Linearidad del sistema.

El análisis de la linealidad de la curva estándar (respuesta del sistema), se realiza por duplicado con soluciones estándar cuando menos a 5 diferentes concentraciones, normalmente entre el 50% y el 150% del valor normal ensayado.

b) Linearidad del método.

Se realiza por duplicado con placebos adicionados del principio activo, cuando menos en 5 diferentes concentraciones, generalmente entre el 50% y 150% del valor normal ensayado.

CRITERIO:

El método analítico se designará lineal cuando la curva encontrada en el sistema y en el método demuestre ser una línea recta a través de los siguientes parámetros: ⁽¹⁰⁾

$$m \text{ aprox.} = 1 \quad r > 0.99$$

$$b \text{ aprox.} = 0 \quad r > 0.98$$

Regla de decisión:

$F_r > F$ (g_{lr} , g_{ler} ; 0.99), en tablas.

$F_{fa} < F$ (g_{lfa} , g_{lep} ; 0.99), en tablas.

T calculada $m < T$ ($n-1$, 0.95), en tablas.

T calculada $b < T$ ($n-1$, 0.95), en tablas.

2.3.2 ESPECIFICIDAD.

Establece en que grado la medición obtenida se debe exclusivamente a la sustancia a evaluar y no a otros componentes que puedan estar presentes en el material a ser analizado. ⁽¹¹⁾

Para determinar este parámetro deberán realizarse las siguientes pruebas.

- Analizar el placebo utilizando el método propuesto.
- Identificar la respuesta del principio o principios activos, excipientes y otras sustancias presentes en la muestra.

- Si los productos de degradación son conocidos, deberán incluirse en el análisis, para comprobar su separación del(os) compuesto(s) a evaluar.

CRITERIO:

El método debe estar exento de interferencias, debido a sustancias extrañas a los principios activos de interés.

2.3.3 EXACTITUD DEL METODO.

Es la concordancia entre un valor experimental y el valor aceptado como referencia. Se determina mediante el análisis de 6 muestras de placebo adicionadas de estándar para cada una de 3 diferentes concentraciones. Cada muestra contendrá la cantidad correspondiente de placebo y el (los) estándar (es) de interés en las concentraciones indicadas. Midiendo el % teórico recuperado.

CRITERIO:

C. V. < 2 %

T student calculada < T (n-1, 0.95), en tablas.

2.3.4 PRECISION DEL SISTEMA Y DEL METODO.

Precisión es el grado de concordancia entre mediciones repetidas de una misma propiedad, de una muestra homogénea del producto y se expresa en términos de repetibilidad y/o reproducibilidad.

c) Precisión del sistema.

Este parámetro se determina realizando 6 inyecciones de una misma solución estándar al 100 % del nivel normal ensayado.

CRITERIO:

C. V. < 2 %

a) Repetibilidad del método.

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes, realizadas por un mismo analista, usando el mismo equipo y métodos.

CRITERIO:

C. V. < 2 %

b) Reproducibilidad.

Es la precisión de un método de análisis expresado como la concordancia entre determinaciones realizadas por diferentes analistas, en distintos días y/o laboratorios, utilizando los mismos y/o diferentes equipos. Debe trabajarse de manera independiente y con una muestra homogénea del producto.

CRITERIO:

C. V. < 2 %

Regla de decisión:

F calculada < F (0.95), en tablas de distribución.

PARAMETROS ESTADISTICOS EMPLEADOS (9)

1. MEDIA (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2. PENDIENTE DE LA CURVA (m)

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

3. INTERCEPTO EN EL EJE DE LAS ORDENADAS (b)

$$b = y - mx$$

4. COEFICIENTE DE CORRELACION (r)

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}}$$

5. COEFICIENTE DE DETERMINACION (r^2)

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

6. ERROR ESTANDAR DE REGRESION ($S_{y/x}$)

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{n \sum (y - \bar{y})^2}{n-2}}$$

7. DESVIACION ESTANDAR (DE)

$$DE = \sqrt{\frac{n \sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

8. COEFICIENTE DE VARIACION (C.V.)

$$C.V. = \frac{DE \times 100}{\bar{x}}$$

9. ERROR ESTANDAR (ES)

$$ES = \frac{DE}{\sqrt{n}}$$

10. T de STUDENT (T)

$$T = \frac{(\bar{x} - 100) \sqrt{n}}{DE}$$

11. LIMITES DE CONFIANZA PARA EL 95 % DE PROBABILIDAD
(L.C. 95%)

$$L. C. = \bar{x} \pm \frac{T (DE)}{n}$$

12. TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LINEARIDAD.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F. CALC.
REGRESION	1	$m \cdot S_{xy} + b(Sy) - \frac{(Sy)^2}{n}$	SC_r	SC_r/MC_r
ERROR DE REGRESION	n-2	$Sy^2 - m(Sxy) - b(Sy)$	$\frac{SC_{er}}{gl_{er}}$	
FALTA DE AJUSTE	$(n-2) - t(r-1)$	$SC_{er} - SC_{ep}$	$\frac{SC_{fa}}{gl_{fa}}$	MC_{fa}/MC_{er}
ERROR PURO	$t(r-1)$	$Sy^2 - \frac{(SY_i^2)}{r}$	$\frac{SC_{ep}}{gl_{ep}}$	

13. TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA REPRODUCIBILIDAD.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F. CALC.
ANALISTA	a-1	$\frac{SY_i^2}{d \cdot r} - \frac{y^2}{a \cdot d \cdot r}$	$\frac{SC_a}{gl_a}$	$\frac{MC_a}{MC_i}$
DIA	d-1	$\frac{SY_j^2}{d \cdot r} - \frac{y^2}{a \cdot r \cdot d}$	$\frac{SC_d}{gl_d}$	$\frac{MC_d}{MC_i}$
INTERACCION	$(a-1)(d-1)$	$\frac{SY_{ij}^2}{r} - \frac{SY_i^2}{r \cdot a} - \frac{SY_j^2}{r \cdot d} + \frac{y^2}{a \cdot d \cdot r}$	$\frac{SC_i}{gl_i}$	$\frac{MC_i}{MC_e}$
ERROR	$t(r-1)$	$SY_{ijk}^2 - SY_{ij}^2$	$\frac{SC_e}{gl_e}$	

a: número de analistas

d: número de días

r: número de replicaciones.

2.4 HIDROCORTISONA.

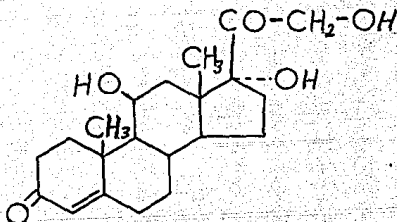
Es un glucocorticoide natural que tiene una acción muy importante en la regulación del metabolismo orgánico, sobre los carbohidratos, proteínas y lípidos y posee una acción reguladora sobre el metabolismo de los electrolitos; también tiene una gran importancia farmacológica por su acción antiinflamatoria.

Las propiedades hormonales adrenocorticales están basadas en la estructura esteroide con 21 átomos de carbono, un doble enlace entre las posiciones 4 y 5, un átomo de oxígeno cetónico en la posición 3 y un grupo hidroxilo alcohólico en la posición 21. (12)

Una actividad sobresaliente de la hidrocortisona es la de suprimir la respuesta inflamatoria de los tejidos a los agentes irritantes, infecciosos y agresivos y es debido a la presencia de oxígeno en las posiciones 11 y 17. La actividad antiinflamatoria se produce directamente sobre los tejidos y no sobre la causa de la inflamación.

Los glucocorticoides se absorben con facilidad por la piel cuando se aplica en forma tópica.

Las tres principales reacciones metabólicas de la hidrocortisona son: a) La reducción del doble enlace situado entre las posiciones 4 y 5 a dihidroxicortisona; b) La pérdida del grupo cetol en la posición 17; c) reducción del grupo carbonilo situado en el carbono 20. Los metabolitos son desechados por medio de las heces y la orina. (2)



HIDROCORTISONA

P.M.: 362.47

(11 β ,17,21-Trihidroxipregn-4-ene-3,20-diona). ⁽¹³⁾

La hidrocortisona es un polvo cristalino de color blanco, con punto de fusión de 217° a 220°C con descomposición. En solución al 1% en dioxano, presenta una rotación específica de +150° a +156°. ⁽²⁾

Solubilidad: En agua (1 en 3500), en metanol (1 en 150), en etanol (1 en 150), poco soluble en cloroformo, escasamente soluble en éter, soluble en ácido sulfúrico con fluorescencia verde. La hidrocortisona puede ser extraída de soluciones neutras con acetato de etilo recientemente destilado. ⁽¹⁴⁾

El espectro de absorción ultravioleta de hidrocortisona en etanol exhibe un máximo a 240 nm (E1%, 1 cm=435).

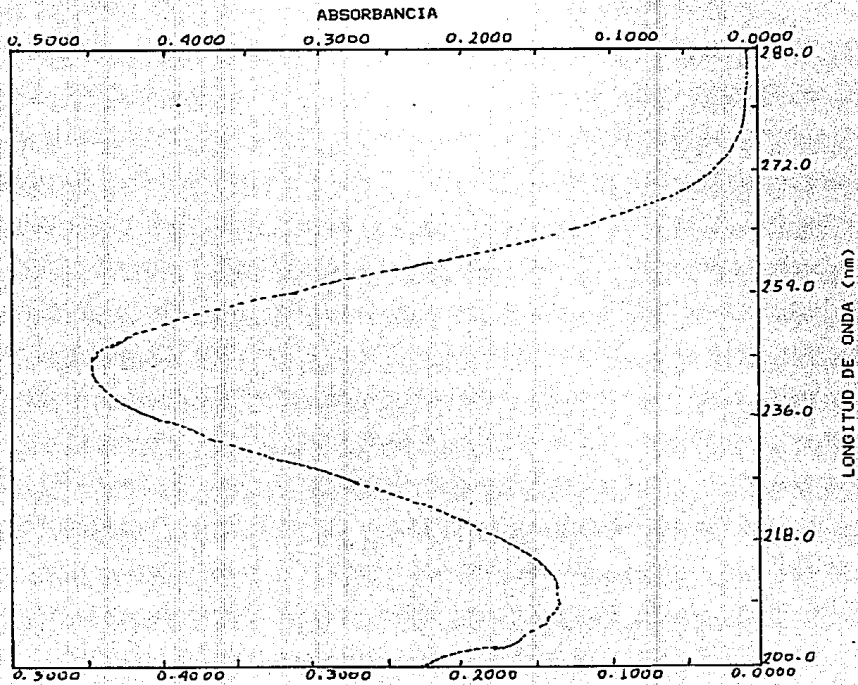


Fig. 5 Espectro de absorción ultravioleta de hidrocortisona.

2.5 CLORAMFENICOL.

El cloramfenicol es un antibiótico de amplio espectro, activo sobre:

- a) Bacterias grampositivas como: Neumococo, Enterococo, Estreptococo beta hemolítico.
- b) Bacterias gramnegativas como: Brucela, Shigella, Hemophilus influenzae, Salmonella thiposa, Salmonella paratyphy.
- c) Espiroquetas como: Borrelia recurrentis y el Treponema pallidum.
- e) Actinomicetas como: Actinomyces israelii.
- f) Micoplasmas como: Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia trachomatis.

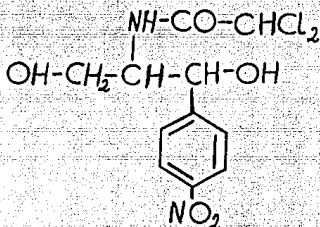
El cloramfenicol inicialmente extraído del Streptomyces venezuelae, es un antibiótico que actualmente se produce por síntesis en escala comercial. En su estructura química encontramos un grupo nitrobenzeno al que probablemente se debe la acción tóxica y una cadena lateral que posee un grupo dicloroacetamida al que se deben las propiedades antimicrobianas. (12)

En la estructura química encontramos dos carbonos asimétricos, por tanto existen cuatro estereoisómeros, pero solamente el compuesto que tiene la configuración D(-)-treo es el antibiótico activo.

El cloramfenicol es ampliamente distribuido en los tejidos del organismo y es rápida y completamente absorbido en el tracto intestinal, aparece en la sangre dentro de los 30 minutos de

su ingestión.

En su mayor parte, el cloramfenicol es inactivado en el hígado por conjugación con el ácido glucurónico y por hidrólisis con formación de arilaminas. La mayor parte de estos metabolitos son excretados por medio de la orina.



CLORAMFENICOL

P.M.: 323.14

(D-Treo-2-dicloroacetamido-1-p-nitrofenilpropano-1,3-diol) ⁽¹³⁾

El cloramfenicol se presenta como cristales de color blanco, con punto de fusión de 150° a 153°C. Una solución en acetato de etilo caracteriza una rotación levógiara, mientras que la solución en etanol presenta rotación dextrógiara. La rotación específica de una solución al 5% en etanol es de +18.5° a +21.5°.

El espectro de absorción ultravioleta de cloramfenicol en agua presenta un máximo a 278 nm (E1%, 1 cm=298).

Solubilidad: En agua (1 en 400), muy soluble en etanol y metanol, escasamente soluble en éter y cloroformo. ⁽¹⁴⁾

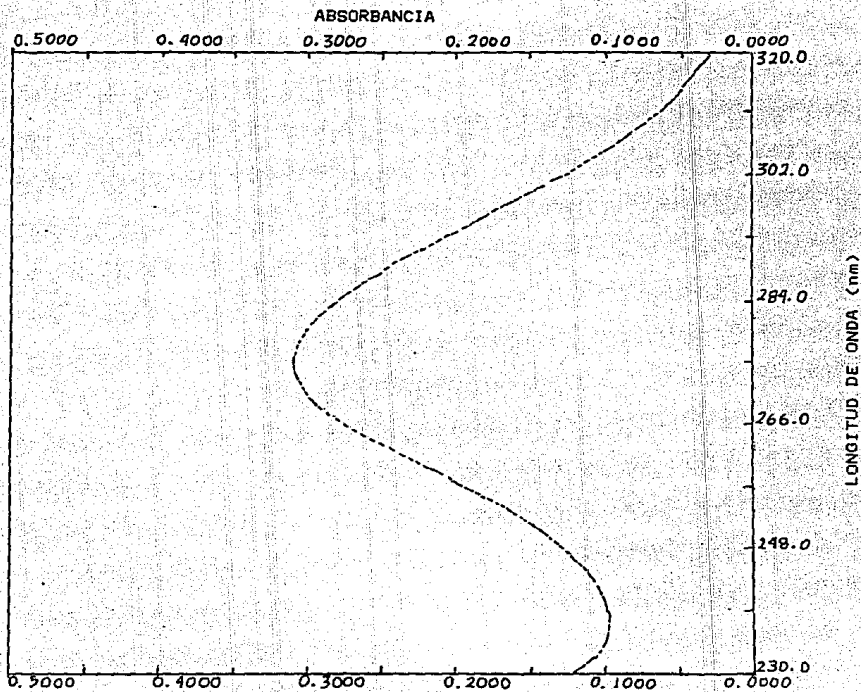


Fig. 6 Espectro de absorción ultravioleta de cloramfenicol.

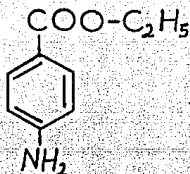
2.5 BENZOCAINA

Los anestésicos locales no nitrogenados son ésteres simples del ácido p-aminobenzoico, a pesar de ser poco solubles y de limitada potencia, son muy útiles para el uso tópico, dentro de este grupo tenemos al p-aminobenzoato de etilo, comunmente conocido como benzocaína.

Para que un anestésico local cumpla con su objetivo, es decir bloquear la conducción de una fibra nerviosa, debe penetrar en ella, por lo tanto debe ser suficientemente liposoluble para penetrar a través de la membrana nerviosa y también hidrosoluble para difundirse en el líquido intersticial que rodea al nervio.

La benzocaína cuenta en su estructura con dos grupos funcionales importantes: a) Un grupo lipofílico con la función éster; b) un grupo hidrofílico en el otro extremo con la función amina. (12)

A las concentraciones usadas normalmente (2 a 10%) la benzocaína no se considera tóxica ni irritante comparada con otros anestésicos locales como la cocaína que es diez veces más tóxica. La benzocaína es metabolizada mediante hidrólisis a ácido p-aminobenzoico. (2)



BENZOCAINA (p-aminobenzoato de etilo). ⁽¹³⁾

P.M.: 165.19

La benzocaína se presenta como polvo cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 88° a 91° C. Es muy estable al aire. La benzocaína es extraída por disolventes orgánicos de soluciones acuosas ácidas o alcalinas. ⁽²⁾

Solubilidad: En agua (1 en 2500), en etanol (1 en 8), en cloroformo (1 en 2), en éter (1 en 4). Es soluble en soluciones ácidas diluídas. ⁽¹⁵⁾

El espectro de absorción ultravioleta de la benzocaína en etanol presenta un máximo a 278 nm.

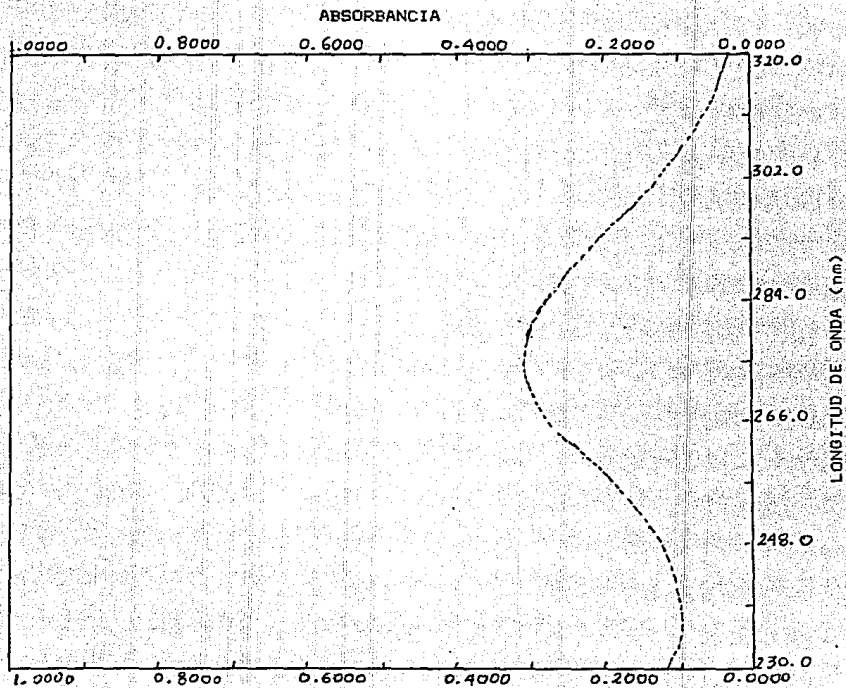


Fig. 7 Espectro de absorción ultravioleta de benzocafina.

3. DESARROLLO DEL METODO.

3.1 FORMULA DE LA SOLUCION OTICA.

Cada 100 ml contienen:	
Hidrocortisona	1.00 g
Cloramfenicol	2.50 g
Benzocaína	2.00 g
Vehículo c.b.p.	100.00 ml

3.2 ELECCION DE LA LONGITUD DE ONDA.

El método analítico a desarrollar, involucra la cuantificación de benzocaína, cloramfenicol e hidrocortisona en forma simultánea, por lo tanto es conveniente definir un intervalo de longitud de onda en el cual los tres principios activos presenten absorbancia en un grado adecuado. Al revisar los espectros de absorción ultravioleta presentados en las figuras 5, 6 y 7 de los compuestos a evaluar, se fija el intervalo de 240 a 270 nm en el cual los mencionados principios activos presentan absorbancia aunque en grado diferente.

Tomando en cuenta la concentración de cada uno de ellos en la solución óptica a evaluar y de acuerdo a su absorptividad, se propone realizar las pruebas preliminares para el desarrollo de método a la longitud de onda de 254 nm, para que las respuestas de cada principio activo en el sistema cromatográfico sean similares.

3.3 ELECCION DE LA COLUMNA.

De acuerdo al diagrama presentado en la figura No. 8, por las propiedades de solubilidad en disolventes orgánicos que presentan los compuestos de interés, la columna señalada es de fase enlazada, y como primera selección se indica la columna de fase inversa, como segunda opción se maneja la columna de fase normal.

3.4 SELECCION DE FASE MOVIL.

Una vez establecidas la columna y la muestra, la separación de los compuestos a evaluar depende de utilizar la fase móvil a apropiada, en el diagrama de la figura No. 8, indica realizar pruebas iniciales con mezcla de metanol y agua como fase móvil. De acuerdo con los resultados obtenidos se realizarán modificaciones en cuanto a concentraciones y/o disolventes con selectividad apropiada .

3.5 PARTE EXPERIMENTAL.

Equipos:

- Sistema de distribución de disolventes, Beckman, modelo 114M.
- Inyector manual, marca Beckman.
- Detector de longitud de onda variable, Beckman, modelo 163.
- Integrador Beckman, modelo 427.

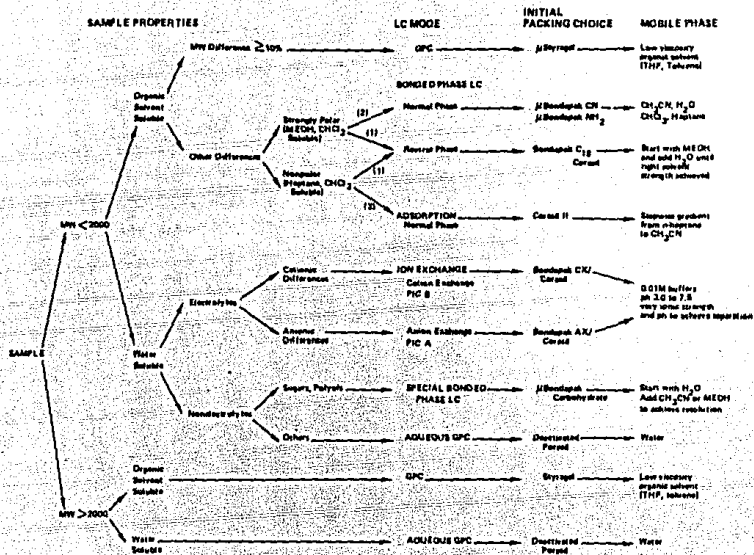


Fig. 8 Esquema con los diferentes métodos de cromatografía de líquidos.

1a. prueba.

Condiciones cromatográficas:

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Metanol:agua (30:70).

Flujo: 0.7 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Preparación de la muestra: tomar 1 ml de solución óptica y aforar a 100 ml con metanol.

Observaciones:

En el cromatograma se observan varios picos con tiempo de retención entre 1.5 y 3.0 min, sin resolución entre ellos. El objeto de esta prueba, sin preparación de soluciones estándares es obtener una idea de las características de los picos obtenidos en el sistema cromatográfico.



Fig. 9. Cromatograma de la 1a. prueba.

Conclusiones:

Para mejorar la resolución entre los picos obtenidos en la prueba anterior, es aconsejable retardar el tiempo de retención de los mismos, por tanto es necesario incrementar la polaridad de la fase móvil, por ejemplo; metanol:agua (20:80).

2a. prueba.**Condiciones cromatográficas:**

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Metanol:agua (20:80).

Flujo: 1.0 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Preparación de los estándares: Por separado preparar las siguientes soluciones.

- Benzocafna: 20 mg/100ml de metanol.
- Cloramfenicol: 25 mg/100 ml de metanol.
- Hidrocortisona: 10 mg/100 ml de metanol.

Observaciones:

En los cromatogramas obtenidos, observamos deficiente resolución entre los picos de los componentes de interés, con los siguientes tiempos de retención:

<u>Componente</u>	<u>Tiempo de retención</u>
Cloramfenicol	4.80 min
Benzocaína	5.25 min
Hidrocortisona	6.06 min

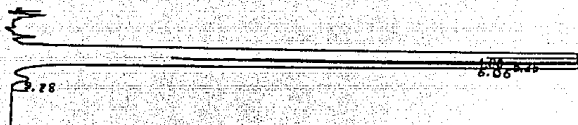


Fig. 10 Cromatograma de la 2a. prueba.

Conclusiones:

El metanol muestra reducida selectividad en éste sistema cromatográfico. La información recabada en la bibliografía (4), para la separación de esteroides como la hidrocortisona y sus derivados, se refiere a sistemas cromatográficos con diferentes concentraciones de disolventes (acetonitrilo y agua) en la fase móvil y muestra diferentes grados de separación.

Se verificará en el desarrollo de nuestro método, la selectividad del acetonitrilo para con los principios activos de interés.

3a. Prueba

Condiciones cromatográficas:

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (20:80).

Flujo: 1.0 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Preparación de los estándares: Por separado preparar las siguientes soluciones usando como disolvente; acetonitrilo:agua (50:50).

- Benzocaína: 20 mg/100ml de disolvente.
- Cloramfenicol: 25 mg/100 ml de disolvente.
- Hidrocortisona: 10 mg/100 ml de disolvente.

Preparación de la muestra: tomar 1 ml de solución ótica y aforar a 100 ml con disolvente.

Observaciones:

El cromatograma de la muestra indica excesiva separación de acuerdo a los siguientes tiempos de retención:

<u>Componente</u>	<u>Tiempo de retención</u>
Cloramfenicol	7.53 min
Benzocaína	11.87 min
Hidrocortisona	15.79 min

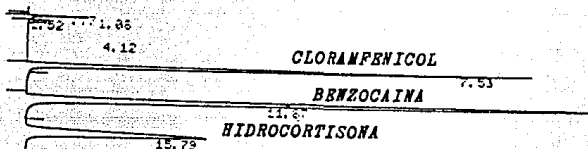


Fig. 11 Cromatograma de la 3a. prueba.

Conclusiones:

Disminuir la polaridad de la fase móvil (incrementando la concentración de acetonitrilo), para disminuir los tiempos de retención de los componentes. No se observan picos que interfieran con los mencionados principios activos.

4a. Prueba

Condiciones cromatográficas:

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (25:75).

Flujo: 1.0 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Preparación de los estándares: Por separado preparar las siguientes soluciones usando como disolvente; acetonitrilo:agua (50:50).

- Benzocaína: 20 mg/100ml de disolvente, (c=0.2 mg/ml).
- Cloramfenicol: 25 mg/100 ml de disolvente, (c=0.25 mg/ml).
- Hidrocortisona: 10 mg/100 ml de disolvente, (c=0.1 mg/ml).

Preparación de la muestra: tomar 1 ml de solución ótica y aforar a 100 ml con disolvente.

Observaciones:

Existe separación entre los tres componentes, pero con deficiente resolución debido en parte al ancho de la base de los picos por altas concentraciones de los principios activos.

En comparación con el sistema anterior, se observa un cambio en el orden de elución entre la hidrocortisona y la benzocaína.

Fase móvil:	Acetonitrilo:20 Agua 180	Acetonitrilo:25 Agua 175
<u>Componente</u>	<u>T. de retención</u>	<u>T. de retención</u>
Cloramfenicol	7.53 min	3.74 min
Benzocaína	11.87 min	6.35 min
Hidrocortisona	15.79 min	5.36 min

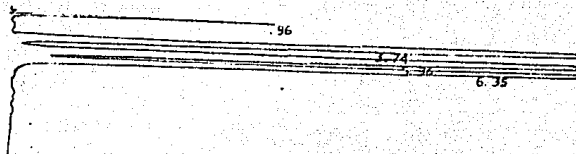


Fig. 12 Cromatograma de la 4a. prueba.

Conclusiones:

Realizar una prueba con las mismas condiciones cromatográficas, disminuyendo la concentración de los compuestos a evaluar, así como reduciendo la velocidad del flujo.

5a. Prueba**Condiciones cromatográficas:**

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (25:75).

Flujo: 0.7 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Preparación de los estándares: Por separado preparar las siguientes soluciones usando como disolvente, acetonitrilo:agua (50:50).

- Benzocafna: conc. = 0.008 mg/ml
- Cloramfenicol: conc. = 0.010 mg/ml
- Hidrocortisona: conc. = 0.004 mg/ml

Preparación de la muestra: tomar 1 ml de solución ática y aforar a 100 ml con disolvente.

Observaciones:

Componente	Tiempo de retención
Cloramfenicol	5.60 min.
Hidrocortisona	8.30 min.
Benzocafna	9.23 min.

El cromatograma de la muestra indica excelente separación entre los picos de cloramfenicol e hidrocortisona, pero deficiente resolución entre hidrocortisona y benzocafna. No se observan picos extraños junto a los picos de interés.

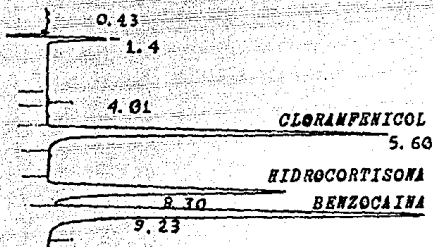


Fig. 13 Cromatograma de la 5a. prueba.

Conclusiones:

Para mejorar la separación entre hidrocortisona y benzocafna es necesario disminuir el tiempo de retención de la hidrocortisona o retardar el tiempo de retención de la benzocafna. De acuerdo con pruebas anteriores, el acetonitrilo muestra más selectividad por la hidrocortisona.

Aumentar la concentración de acetonitrilo en la fase móvil es la recomendación para optimizar la resolución.

6a. Prueba

Condiciones cromatográficas:

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (27:73).

Flujo: 0.6 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Preparación de los estándares: Por separado preparar las siguientes soluciones usando fase móvil como disolvente.

- Benzocaina: conc.= 0.008 mg/ml
- Cloramfenicol: conc.= 0.010 mg/ml
- Hidrocortisona: conc.= 0.004 mg/ml

Preparación de la muestra: tomar 1 ml de solución ótica y aforar a 100 ml con fase móvil.

Observaciones:

<u>Componente</u>	<u>Tiempo de retención</u>
Cloramfenicol	6.03 min
Hidrocortisona	8.44 min
Benzocafna	10.0 min

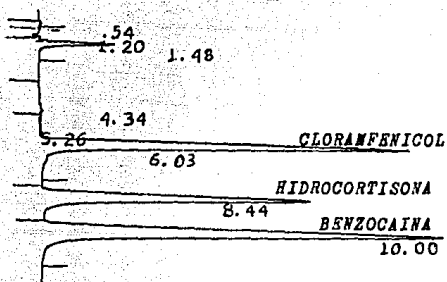


Fig. 14 Cromatograma de la 6a. prueba.

Conclusiones:

La separación entre los picos de los activos de interés es completa, es recomendable aumentar el flujo a 0.7 ml para optimizar el tiempo de análisis, verificando la resolución.

7a. Prueba

Condiciones cromatográficas:

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (27:73).

Flujo: 0.7 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Preparación de los estándares: Por separado preparar las siguientes soluciones usando fase móvil como disolvente.

- Benzocaína: transferir 40 mg de estándar a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con fase móvil. Tomar una alícuota de 4 ml y aforar a 100 ml con fase móvil.
- Cloramfenicol: transferir 50 mg de estándar a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con fase móvil. Tomar una alícuota de 4 ml y aforar a 100 ml con fase móvil.
- Hidrocortisona: transferir 20 mg de estándar a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con fase móvil. Tomar una alícuota de 4 ml y aforar a 100 ml con fase móvil.
- Preparación de la muestra: transferir una alícuota de 2 ml de solución óptica a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con fase móvil. Tomar una alícuota de 4 ml y aforar a 100 ml con fase móvil.

Observaciones:

<u>Componente</u>	<u>Tiempo de retención</u>
Volumen muerto	1.38 min
Cloramfenicol	4.96 min
Hidrocortisona	6.74 min
Benzocaína	8.32 min

La separación entre los componentes a evaluar es completa.

Es muy importante señalar que en los diferentes experimentos realizados para el desarrollo del método analítico, no se detectaron posibles interferencias.

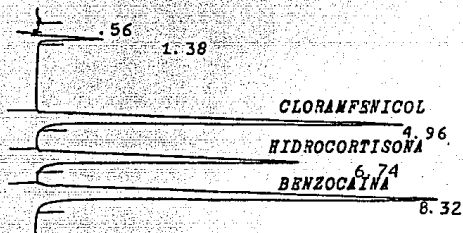


Fig. 15 Cromatograma de la 7a. prueba.

Conclusiones:

Las condiciones del sistema cromatográfico en esta última prueba se consideran convenientes para el método buscado, pues la separación entre los picos es adecuada.

Para facilitar la disolución total de los estándares es recomendable disolver previamente en 20 ml de acetonitrilo y posteriormente aforar y realizar las siguientes diluciones utilizando fase móvil. Este mismo procedimiento se aplica en la preparación de la muestra.

El estándar interno a elegir contará además de las propiedades señaladas en la página 17, con un tiempo de retención situado en alguno de los dos casos siguientes.

- $1.38 \text{ min} < t. \text{ retención de estándar interno} < 4.96 \text{ min}$
- $8.32 \text{ min} < t. \text{ retención de estándar interno}$

8a. Prueba (Selección del estándar interno).

Condiciones cromatográficas:

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (27:73).

Flujo: 0.7 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Observaciones:

De los estándares analizados, el compuesto más adecuado a los requerimientos de estándar interno para nuestro método analítico es el éter glicérico del guayacol (guaifenesina).

<u>Componente</u>	<u>Tiempo de retención</u>
Volumen muerto	1.36 min
Guaifenesina	2.22 min
Cloramfenicol	4.96 min
Hidrocortisona	6.74 min
Benzocafna	8.32 min

La concentración final del estándar interno para que su respuesta cromatográfica sea similar a las respuestas de los principios activos es: 0.08 mg/ml.

3.6 METODO DE ANALISIS A VALIDAR.

Condiciones cromatográficas:

Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long. x 4.5 mm. de diam. interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (27:73).

Flujo: 0.7 ml/min.

Detector: 254 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Presión: 1.0 kpsi

Rango: 0.05

Condiciones del integrador:

Atenuación: 16

Vel. de carta: 0.5 cm/min.

Area mínima de rechazo: 50 000

Amplitud de pico (PW): 3

Preparación del estándar interno.

Transferir 50 mg de guaifenesina estándar a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y aforar con fase móvil.

Preparación de la muestra.

Tomar una alícuota de 2 ml de muestra y pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, dejar escurrir perfectamente la pipeta, adicionar 20 ml de acetonitrilo, agitar durante 5 min. en baño ultrasónico y aforar con fase móvil. Transferir 4 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 4 ml de so-

lución del estándar interno y aforar con fase móvil, agitar perfectamente. Esta es la solución final de muestra.

Preparación de solución de estándares.

Pesar con exactitud cerca de 50 mg de cloramfenicol, 40 mg de benzocaína y 20 mg de hidrocortisona, estándares de referencia y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 20 ml de acetonitrilo y agitar durante 5 min. en baño ultrasónico, aforar con fase móvil. Pasar 4 ml de ésta solución a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 4 ml de solución del estándar interno y aforar con fase móvil, ésta es la solución final de estándares.

Antes de inyectar al cromatógrafo, filtrar las soluciones finales de muestra y estándares por papel filtro MILLIPORE HVLP 01300 de 0.45 micras ó equivalente.

Concentraciones finales:

Guaifenesina	0.080 mg/ml
Cloramfenicol	0.020 mg/ml
Hidrocortisona	0.008 mg/ml
Benzocaína	0.016 mg/ml

4. RESULTADOS DE LA VALIDACION.

4.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA:

Cloramfenicol

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECIBRO
25.0	25.21	100.8
25.0	24.97	99.9
37.5	37.35	99.6
37.5	37.39	99.7
50.0	50.02	100.0
50.0	49.98	100.0
62.5	62.18	99.5
62.5	62.58	100.1
75.0	75.59	100.8
75.0	75.79	101.1

Pendiente = 1.0100
 Intercepto = -0.1510
 Coeficiente de correlación = 0.9999
 Coeficiente de determinación = 0.9998
 Error estándar de regresión = 0.1227

Fr = 33875.3

Ffa = -0.8432

F (glr, gler; 0.99), en tablas = 11.3

F (glfa, glep; 0.99), en tablas = 12.1

CRITERIO:

Pendiente: valor cercano a 1

Intercepto: valor cercano a 0

Coeficiente de correlación > 0.99

Coeficiente de determinación > 0.98

Regla de decisión:

Fr > F (glr, gler; 0.99)

Ffa < F (glfa, glep; 0.99)

CONCLUSION:

El sistema lineal es correcto.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Cloramfenicol

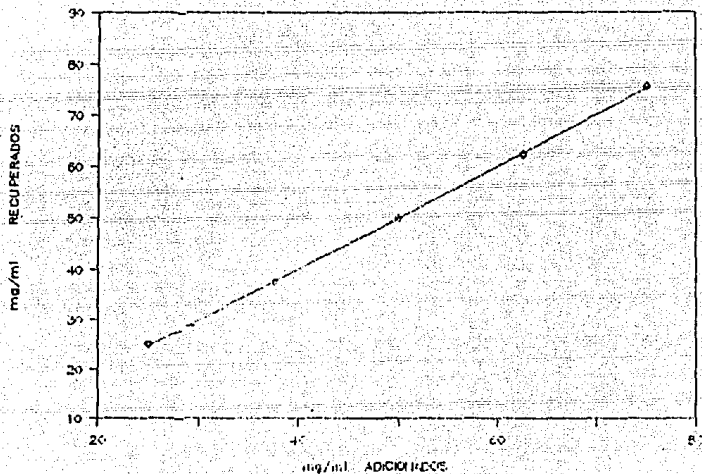


Fig. 16. Gráfica de la linealidad del sistema para cloramfenicol.

4.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA:

Hidrocortisona

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
10.0	10.09	100.9
10.0	10.03	100.3
15.0	14.93	99.6
15.0	15.04	100.3
20.0	19.98	99.9
20.0	20.03	100.1
25.0	25.03	100.1
25.0	25.30	101.2
30.0	30.54	101.8
30.0	30.58	101.9

Pendiente = 1.024
 Intercepto = -0.127
 Coeficiente de correlación = 0.9998
 Coeficiente de determinación = 0.9996
 Error estándar de regresión = 0.0662

Fr = 1911.3

Ffa = -1.427

F (glr, gler; 0.99), en tablas = 11.3

F (glfa, glep; 0.99), en tablas = 12.1

CRITERIO:

Pendiente: valor cercano a 1
 Intercepto: valor cercano a 0
 Coeficiente de correlación > 0.99
 Coeficiente de determinación > 0.98

Regla de decisión:

Fr > F (glr, gler; 0.99)

Ffa < F (glfa, glep; 0.99)

CONCLUSION:

El sistema lineal es correcto.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Hidro cortisona

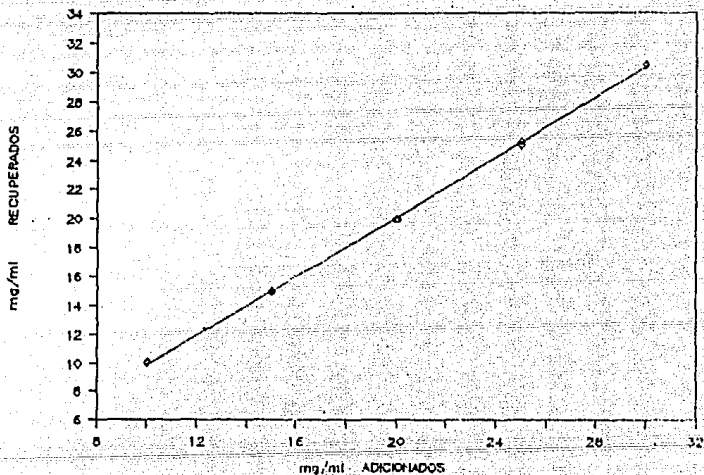


Fig. 17 Gráfica de la linealidad del sistema para hidro cortisona.

4.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA:

Benzocafina

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
20.0	20.19	101.0
20.0	20.10	100.5
30.0	29.88	99.6
30.0	30.01	100.0
40.0	39.98	99.9
40.0	40.02	100.1
50.0	49.88	99.8
50.0	50.10	100.2
60.0	60.70	101.2
60.0	60.70	101.2

Pendiente = 1.0120
 Intercepto = 0.1234
 Coeficiente de correlación = 0.9999
 Coeficiente de determinación = 0.9997
 Error estándar de regresión = 0.1055

Fr = 39399.6

Ffa = -1.0572

F (glr, gler; 0.99), en tablas = 11.3

F (glfa, glep; 0.99), en tablas = 12.1

CRITERIO:

Pendiente: valor cercano a 1
 Intercepto: valor cercano a 0
 Coeficiente de correlación > 0.99
 Coeficiente de determinación > 0.98

Regla de decisión:

Fr > F (glr, gler; 0.99)

Ffa < F (glfa, glep; 0.99)

CONCLUSION:

El sistema lineal es correcto

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Benzocaína

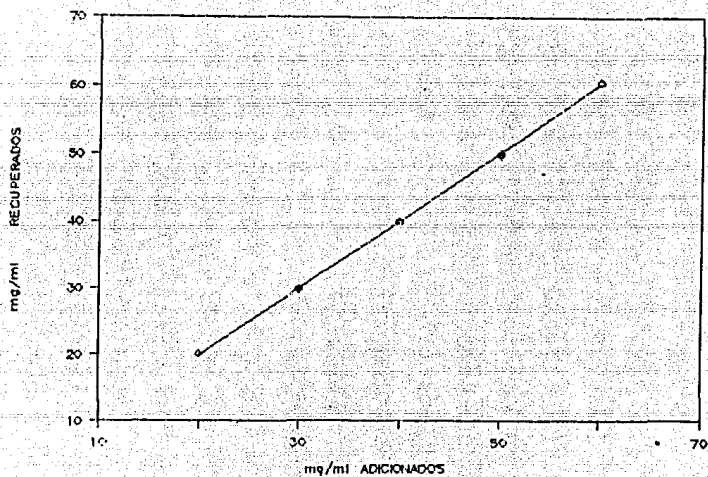


Fig. 18 Gráfica de la linealidad del sistema para benzocaína.

4.2 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA:

Cloramfenicol

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
50.0	49.99	100.0
50.0	50.11	100.2
50.0	49.84	99.7
50.0	50.12	100.2
50.0	49.90	99.8
50.0	50.03	100.1
Coeficiente de variación		= 0.22

CRITERIO:

Coeficiente de variación: < 2 %

CONCLUSION:

El sistema es repetible.

4.2 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA:

Hidrocortisona

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
20.0	19.95	99.7
20.0	19.99	100.0
20.0	19.98	99.9
20.0	19.97	99.9
20.0	20.06	100.3
20.0	20.04	100.2
Coeficiente de variación		= 0.22

CRITERIO:

Coeficiente de variación: < 2 %

CONCLUSION:

El sistema es repetible.

4.2 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA:

Benzocafna

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
40.0	39.88	99.7
40.0	40.11	100.3
40.0	39.94	99.9
40.0	40.01	100.0
40.0	40.12	100.3
40.0	39.95	99.9
Coeficiente de variación		= 0.24

CRITERIO:

Coeficiente de variación: < 2 %

CONCLUSION:

El sistema es repetible.

4.3 LINEARIDAD DEL METODO:

Cloramfenicol

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
25.0	24.41	97.6
25.0	24.88	99.5
37.5	38.87	103.6
37.5	37.24	99.3
50.0	49.91	99.8
50.0	50.10	100.2
62.5	62.87	100.6
62.5	62.72	100.4
75.0	73.47	98.0
75.0	73.81	98.4

Pendiente = 0.9818
 Intercepto = 0.2936
 Coeficiente de correlación = 0.9992
 Coeficiente de determinación = 0.9984
 Error estándar de regresión = 0.3139

Fr = 4890.6

Ffa = 3.7267

F (glr, gler; 0.99), en tablas = 11.3

F (glfa, glep; 0.99), en tablas = 12.1

CRITERIO:

Pendiente: valor cercano a 1

Intercepto: valor cercano a 0

Coeficiente de correlación > 0.99

Coeficiente de determinación > 0.98

Regla de decisión:

Fr > F (glr, gler; 0.99)

Ffa < F (glfa, glep; 0.99)

CONCLUSION:

El método lineal es correcto.

LINEARIDAD DEL METODO

Cloramfenicol

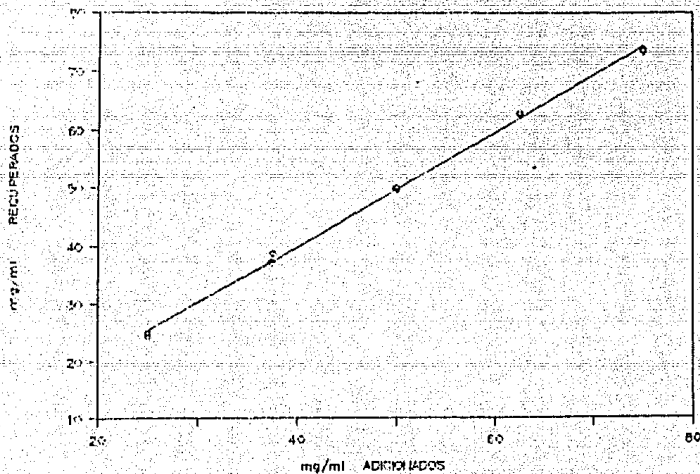


Fig. 19 Gráfica de la linealidad del método para cloramfenicol.

4.3 LINEARIDAD DEL METODO:

Hidrocortisona

mg ADICIONADOS	mg RECLIPERADOS	% RECUBRO
10.0	9.85	98.5
10.0	10.07	100.7
15.0	15.32	102.2
15.0	15.03	100.2
20.0	19.77	98.9
20.0	20.23	101.2
25.0	24.99	100.0
25.0	24.99	100.0
30.0	29.17	97.2
30.0	29.38	97.9

Pendiente = 0.9690
 Intercepto = 0.1997
 Coeficiente de correlación = 0.9993
 Coeficiente de determinación = 0.9985
 Error estándar de regresión = 0.1175

Fr = 5438.0

Ffa = -0.911

F (glr, gler; 0.99), en tablas = 11.3

F (glfa, glep; 0.99), en tablas = 12.1

CRITERIO:

Pendiente: valor cercano a 1

Intercepto: valor cercano a 0

Coeficiente de correlación > 0.99

Coeficiente de determinación > 0.98

Regla de decisión:

Fr > F (glr, gler; 0.99)

Ffa < (glfa, glep; 0.99)

CONCLUSION:

El método lineal es correcto.

LINEARIDAD DEL METODO

Hidroclortisona

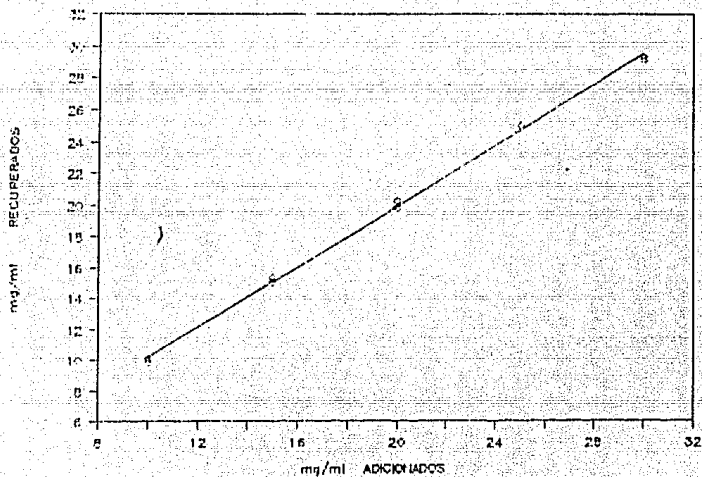


Fig. 20 Gráfica de la linealidad del método para hidroclortisona.

4.3 LINEARIDAD DEL METODO:

Benzocafina

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
20.0	19.57	97.9
20.0	19.96	99.8
30.0	31.04	103.5
30.0	29.99	100.0
40.0	39.93	99.8
40.0	40.07	100.2
50.0	50.40	100.8
50.0	50.36	100.7
60.0	58.76	97.9
60.0	59.05	98.4

Pendiente = 0.9817
 Intercepto = 0.2584
 Coeficiente de correlación = 0.9992
 Coeficiente de determinación = 0.9983
 Error estándar de regresión = 0.3540

Fr = 4780.6

Ffa = 1.863

F (glr, gler; 0.99), en tablas = 11.3

F (glfa, glfe; 0.99), en tablas = 12.1

CRITERIO:

Pendiente: valor cercano a 1
 Intercepto: valor cercano a 0
 Coeficiente de correlación > 0.99
 Coeficiente de determinación > 0.98

Regla de decisión:

Fr > F (glr, gler; 0.99)

Ffa < F (glfa, glfe; 0.99)

CONCLUSION:

El método lineal es correcto.

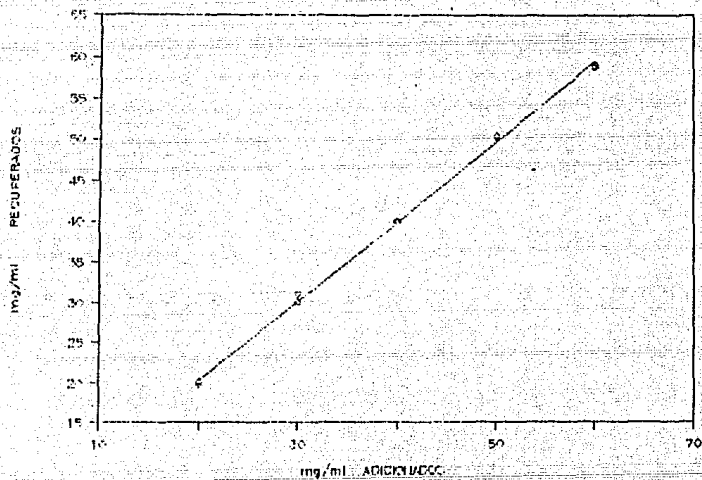
LINEARIDAD DEL METODOBenzocafna

Fig. 21 Gráfica de la linealidad del método para benzocafna.

4.4 ESPECIFICIDAD

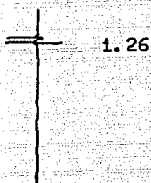
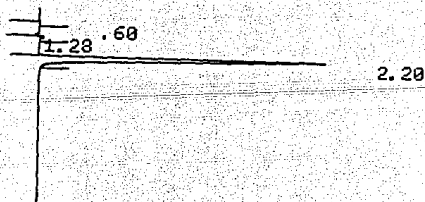


Fig. 22 Cromatograma del placebo

Fig. 23 Cromatograma de guaifenesina
(estándar interno).

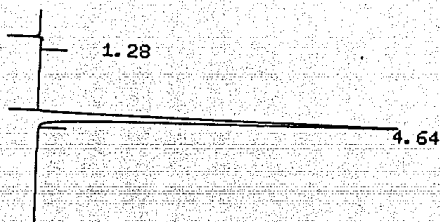


Fig. 24 Cromatograma de cloramfenicol

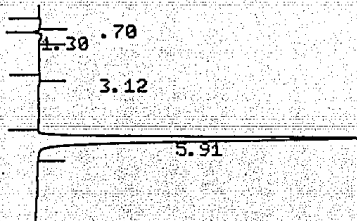


Fig. 25 Cromatograma de hidrocortisona.

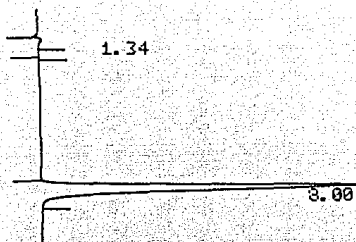


Fig. 26 Cromatograma de benzocaína.

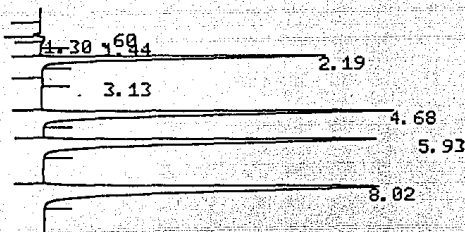


Fig. 26 Cromatograma de la muestra de solución ótica
adicionado de estándar interno.

CONCLUSIONES:

El método carece de interferencias, por lo tanto se considera específico.

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Cloramfenicol

mg ADICIONADO	mg RECUPERADO	% RECOBRO
37.5	37.83	100.9
37.5	38.23	101.9
37.5	37.55	100.1
37.5	39.35	104.9
37.5	38.35	102.3
37.5	38.01	101.4
50.0	49.50	99.0
50.0	49.24	98.5
50.0	50.03	100.1
50.0	49.79	99.6
50.0	49.17	98.3
50.0	49.29	98.6
62.5	61.52	98.4
62.5	61.04	97.7
62.5	60.92	97.5
62.5	61.55	98.5
62.5	61.25	98.0
62.5	61.23	98.0

Media	=	99.64 %
Desviación estándar	=	1.98
Coefficiente de variación	=	1.99 %
T calculada	=	0.7718

EN TABLAS:

T (n-1, 95)	=	2.1098
-------------	---	--------

CRITERIO:

Coefficiente de variación < 2.0 %

Regla de decisión:

T calculada < T(n-1, 95), en tablas.

CONCLUSIONES:

El método es exacto y repetible.

4.5 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Hidro cortisona

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
15.0	15.26	101.8
15.0	15.23	101.5
15.0	15.06	100.4
15.0	15.19	101.3
15.0	15.26	101.8
15.0	15.24	101.6
20.0	19.86	99.3
20.0	19.90	99.5
20.0	19.61	98.1
20.0	19.96	99.8
20.0	19.87	99.3
20.0	19.72	98.6
25.0	24.78	99.1
25.0	24.51	98.0
25.0	24.49	98.0
25.0	24.82	99.3
25.0	24.49	98.0
25.0	24.62	98.5

Media	=	99.65 %
Desviación estándar	=	1.40
Coefficiente de variación	=	1.41 %
T calculada	=	1.0696

EN TABLAS:		
T (n-1, 95)	=	2.1098

CRITERIO:

Coefficiente de variación < 2.0 %

Regla de decisión:

T calculada < T (n-1, 95), en tablas.

CONCLUSIONES:

El método es exacto y repetible.

4.5 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Benzocafna

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECOBRO
30.0	30.43	101.4
30.0	30.16	100.5
30.0	30.29	101.0
30.0	30.21	100.7
30.0	30.58	101.9
30.0	30.37	101.2
40.0	39.11	97.8
40.0	39.04	97.6
40.0	39.03	97.6
40.0	39.57	98.9
40.0	39.59	99.0
40.0	39.17	97.9
50.0	49.58	99.2
50.0	49.15	98.3
50.0	49.28	98.6
50.0	49.69	99.4
50.0	49.15	98.3
50.0	49.38	98.8

Media	=	99.33 %
Desviación estándar	=	1.42
Coefficiente de variación	=	1.43 %
T Calculada	=	1.9981

EN TABLAS:

T (n-1, 95)	=	2.1098
-------------	---	--------

CRITERIO:

Coeficiente de variación < 2 %

Regla de decisión:

T calculada < T (n-1, 95), en tablas.

CONCLUSIONES:

El método es exacto y repetible.

4.6 REPRODUCIBILIDAD: CLORAMFENICOL
SOLUCION OTICA
LOTE: T-1060

		ANALISTA	
		1	2
D	1	97.71	97.15
		97.50	96.98
		97.80	98.07
A	2	97.87	96.89
		97.53	98.32
		96.12	97.09

Media = 97.42 %
Desviación estándar = 0.60
Coeficiente de variación = 0.62 %

ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC.	F (0.95) TABLAS
DIA	0.161008	1	0.161008	0.764249	161.45
ANALISTA	0.000075	1	0.000075	0.000355	161.45
INTERACCION	0.210675	1	0.210675	0.460928	5.32
ERROR	3.656533	8	0.457066		
TOTAL	4.028291	11			

CRITERIO:

F calculada < F (0.95) de tablas de distribución.

CONCLUSIONES:

El método analítico es reproducible.

REPRODUCIBILIDAD: HIDROCORTISONA
SOLUCION OTICA
LOTE: T-1060

		ANALISTA	
		1	2
D	1	96.85	96.37
		96.35	96.03
		96.66	97.08
A	2	97.69	96.92
		97.49	98.1
		96.18	96.99

Media = 96.89 %
Desviación estándar = 0.63
Coeficiente de variación = 0.65 %

ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC.	F (0.95) TABLAS
DIA	1.353408	1	1.353408	15.30860	161.45
ANALISTA	0.006075	1	0.006075	0.068715	161.45
INTERACCION	0.088408	1	0.088408	0.241938	5.32
ERROR	2.923333	8	0.365416		
TOTAL	4.371225	11			

CRITERIO:

F calculada < F (0.95) de tablas de distribución.

CONCLUSIONES:

El método analítico es reproducible.

4.6 REPRODUCIBILIDAD: BENZOCAINA
SOLUCION OTICA
LOTE: T-1060

		ANALISTA	
		1	2
D	1	98.23	98.30
		97.43	97.09
		98.02	97.86
A	2	96.90	98.19
		99.32	99.65
		98.61	97.86

Media	=	98.12 %
Desviación estándar	=	0.81
Coefficiente de variación	=	0.83 %

ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC.	F (0.95) TABLAS
DIA	1.08	1	1.08	7.668639	161.45
ANALISTA	0.016133	1	0.016133	0.114556	161.45
INTERACCION	0.140833	1	0.140833	0.187652	5.32
ERROR	6.004	8	0.7505		
TOTAL	7.240966	11			

CRITERIO:

F calculada < F (0.95) de tablas de distribución.

CONCLUSIONES:

El método analítico es reproducible.

6. CONCLUSIONES.

El método analítico desarrollado y validado para la cuantificación simultánea de cloramfenicol, hidrocortisona y benzocaína en solución ótica, cumple en forma satisfactoria con todos los parámetros indicados para considerar lineal, específico, preciso y exacto dicho método.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos establece métodos microbiológicos para la valoración de antibióticos como es el caso del cloramfenicol, mientras que la U.S.P. XXII, fija un método de análisis por cromatografía de líquidos para el mismo antibiótico. El valor obtenido en la cuantificación del cloramfenicol por el método desarrollado, representará solo un dato preliminar de utilidad para la continuidad del proceso en la solución ótica. La valoración microbiológica por requerimiento de la Secretaría de Salud, será el resultado representativo en el análisis de la solución.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la validación, el método de análisis cumplirá con su objetivo con absoluta confiabilidad.

6. BIBLIOGRAFIA.

1. SOLUCION GOTAS, método de análisis No. 180970-01, Laboratorios Columbia S. A.
2. Clarke E. G. C., Isolation and identification of drugs, The Pharmaceutical Press, 1978.
3. Hadden and Baumann, Basic Liquid Chromatography, Varian Aerograph, 1972.
4. Liquid Chromatography School, Waters Associates, section solvents.
5. C.K. Lim, HPLC of small molecules, Medical Research Council, U. K. 1986.
6. McNair y Esquivel, Cromatografía Líquida de Alta Presión Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 1980.
7. Data Module Manual, Waters Associates.
8. Procedimiento de validación de métodos analíticos, Laboratorios Columbia S. A.
9. Manual del curso: Estadística Aplicada a la Validación de Métodos Analíticos, Asociación Farmacéutica Mexicana.

10. Pharma News, vol. 1, No. 6, Parámetros estadísticos y procedimiento de validación, criterios de aceptación, Dic. 1990.
11. Alcántara P. Alejandro, Manual del curso: Validación de Métodos Analíticos, Searle de México.
12. Litter Manuel, Compendio de Farmacología, Editorial El Ateneo, 1975.
13. The Merck Index, ninth edition, Merck and Co., 1976.
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. edición, 1988.
15. U. S. Pharmacopeia, XXII, 1990.
16. Remington y Schork, Estadística Biométrica y Sanitaria, Editorial Prentice Hall Internacional, 1977.