



300627
5
ZEJ

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA U.N.A.M.

CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE
FENILEFRINA EN UNA SOLUCION NASAL
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:

ALICIA SILVIA ARIAS USI

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

MEXICO, D.F.

MARZO 1995

FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIA

A mis padres, por que sé que para ustedes éste trabajo es tan importante como para mí. La meta lograda es de ustedes y para ustedes; por su amor y apoyo incondicional, Mil Gracias!!!

A mis hermanos, Tomás y Francisco por su apoyo y consejos para lograr la realización de este trabajo.

A una persona muy especial, Marco; por que tú sabes que este trabajo es también tuyo. Por tu amor y por tu apoyo, Gracias!!!

A mis amigas Lucero, Adriana, Gaby y Tere, por su amistad, consejos y ayuda para la realización de este trabajo.

A mi familia, Gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme.

Con especial agradecimiento al Dr. José D. Méndez F., Q.F.B Ma. de Jesús Ramírez, Q.F.B. José Luis Ibarnea y Q.F.B Angelina Ochoa, por sus consejos y ayuda para la realización del presente trabajo.

A todo el personal de control de calidad y de desarrollo analítico de los laboratorios Syntex; en especial a Manuel Calderón por su apoyo, ayuda y consejos.

Con una dedicatoria especial a una amiga y compañera que desafortunadamente no pudo seguir a nuestro lado y realizar esta meta.

INDICE

	Página
I. Objetivo	1
II. Introducción	2
III. Generalidades.	4
1. Cromatografía	
A. Historia	4
B. Clasificación	5
1.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución.	
A. Características	7
B. Clasificación	8
C. Proceso cromatográfico	13
D. Ventajas y limitaciones	17
E. Definiciones	18
1.2 Equipo e instrumental.	
A. Características generales	21
B. Partes que lo constituyen	22
2. Validación de métodos analíticos.	
A. Linearidad	34
B. Exactitud	35
C. Precisión	35
D. Límite de detección	36
E. Límite de cuantificación	36

F. Especificidad	36
G. Tolerancia	37
H. Estabilidad de la muestra	37

3. Clorhidrato de fenilefrina.

A. Monografía	39
B. Propiedades farmacológicas	43
C. Propiedades toxicológicas	44

IV. Parte experimental	46
-------------------------------	-----------

V. Resultados	53
----------------------	-----------

VI. Análisis de resultados	78
-----------------------------------	-----------

VII. Conclusiones	81
--------------------------	-----------

VIII. Bibliografía	82
---------------------------	-----------

Anexos	85
---------------	-----------

I. OBJETIVO.

Validar un método analítico para la identificación y cuantificación de clorhidrato de fenilefrina en una solución nasal, en producto terminado y para estudios de estabilidad, por cromatografía de líquidos de alta resolución.

II. INTRODUCCION.

Los problemas que se presentan en el campo del análisis farmacéutico son cada día mayores debido al gran incremento de nuevos productos, con moléculas activas nuevas y excipientes novedosos, que requieren de métodos de análisis apropiados. Es por ésto que uno de los principales objetivos de un departamento de control de calidad y de la industria farmacéutica en general, es contar con métodos analíticos que proporcionen resultados confiables, y además, que respalden y aseguren que sus productos se encuentran en condiciones óptimas para su consumo.

Surge entonces la necesidad de contar con métodos analíticos capaces de separar las posibles señales de interferencia originadas por los productos de degradación (si los hay) y/o por los excipientes de la formulación y permitan entonces la cuantificación real del principio activo; es decir, se requiere de métodos analíticos específicos.

Parte integral de un método analítico es la validación del mismo; es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. Una validación debe incluir como mínimo la evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad.

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas; además de proporcionar una medida del comportamiento del método.

Actualmente existen reportados en bibliografía varios métodos analíticos para cuantificar clorhidrato de fenilefrina utilizando diferentes técnicas (espectro U.V., I. R., entre otras). Sin embargo, contemplando que el método por validar sea capaz de separar los productos de degradación de clorhidrato de fenilefrina, es necesario utilizar una técnica de separación. De acuerdo a los recursos físicos con que cuenta el laboratorio donde se desarrollará el proyecto, se optó por emplear cromatografía de líquidos de alta resolución.

Este proyecto consiste en la validación de un método analítico que nos permita identificar y cuantificar el clorhidrato de fenilefrina en una solución nasal mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), una técnica versátil y muy utilizada en los últimos tiempos que nos permite desarrollar métodos analíticos específicos.

El clorhidrato de fenilefrina es un compuesto muy empleado como agente simpaticomimético con efecto principalmente sobre los receptores alfa-adrenérgicos. Su principal uso clínico es como descongestionante nasal.

III. GENERALIDADES.

I. CROMATOGRAFIA.

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra se distribuye entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma, que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria.(1)

A. HISTORIA.

El antecedente más remoto de la cromatografía es el análisis capilar. En 1850 Runge analizó pigmentos vegetales depositando la muestra sobre papel filtro, observando que éstos se separaban en anillos concéntricos de varios colores.(9)

En 1861 Schoenbein cambió este método circular por el unidimensional sumergiendo un extremo de tira de papel en la solución. A ésta técnica se le conoce en la actualidad como cromatografía en papel y se le ha utilizado también para separar proteínas.

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente, el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de elución en un experimento para separar la clorofila de extractos vegetales.(1)

La cromatografía permaneció ignorada durante muchos años. Fué hasta 1930 que el investigador sueco Tiselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas diferentes a la técnica de elución, que son el "análisis frontal" y el "análisis por desplazamiento".

En 1941, Martín y Synge, en busca de una solución al problema de determinar cantidades muy pequeñas de aminoácidos, introdujeron la "cromatografía de reparto", por la que obtuvieron el Premio Nóbel de Química en 1952. Esta técnica evolucionó con rapidez llegando a ser lo que ahora se conoce como cromatografía en papel y una versión limitada de la cromatografía líquido-líquido en columna.

En 1952, Martín y James introdujeron la cromatografía de gases, una de las técnicas analíticas más útiles para el análisis de gases y compuestos orgánicos volátiles.

A pesar de que el primer experimento sobre cromatografía fue una forma de cromatografía líquida, ésta técnica logró avances hasta 1968, los cuales fueron graduales y se debieron a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua.

B. CLASIFICACION.

La separación se realiza en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar como fase estacionaria propiamente dicha o como soporte de una fase estacionaria líquida. También se puede realizar usando como fase estacionaria papel de filtro o un sólido finamente dividido colocado en forma de capa fina sobre una placa de vidrio. Estos tres tipos de cromatografía se basan en los mismos principios fundamentales y se conocen como cromatografía en columna, cromatografía en papel y cromatografía en capa fina respectivamente.⁽¹⁾

En la cromatografía en columna, la fase móvil puede ser un líquido o un gas, y según el caso se denominan respectivamente "cromatografía líquida" y "cromatografía de gases". Esta fase móvil fluye a través del relleno de la columna, arrastrando los componentes de la mezcla que son selectivamente retenidos por la fase estacionaria. El flujo de la fase móvil se mantiene constante a través de todo el proceso, lo que permite que cada componente de la mezcla sea eluido de la columna como un compuesto puro, disuelto en la fase móvil. A ésta técnica se le conoce como "cromatografía de elución".

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, se tiene la siguiente clasificación:

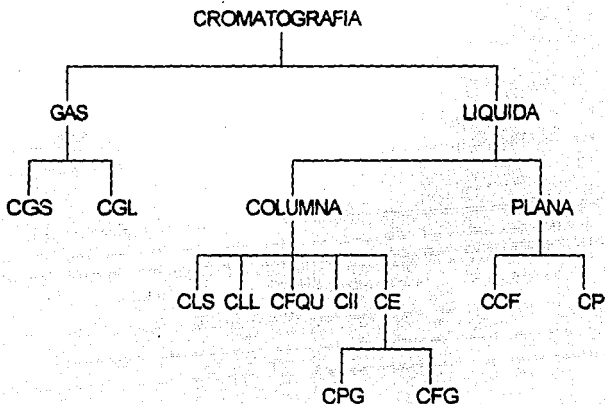


Figura No. 1 CGS cromatografía gas-sólido; CGL cromatografía gas-líquido; CLS cromatografía líquido-sólido; CLL cromatografía líquido-líquido; CFQU cromatografía de fase químicamente unida; CII cromatografía de intercambio iónico; CCF cromatografía de capa fina; CP cromatografía de papel; CE cromatografía de exclusión; CPG cromatografía de permeación en gel; CFG cromatografía de filtración en gel.

1.1 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

A. CARACTERISTICAS.

La cromatografía de líquidos de alta resolución derivó de la cromatografía líquida "clásica", la cual consiste de una columna de vidrio cuyo diámetro varía entre 2 y 10 cm, rellena de algún material como sílice, alúmina, azúcar, etc., cuyas partículas son de un tamaño cercano a los 200 μ m. La muestra, disuelta en la fase móvil o disolvente, se introduce a la columna por medio de un cuentagotas o de una pipeta, y luego se agrega el disolvente con el cual eluye la muestra a través de la columna. Los tamaños de la muestra varían entre 0.1 y 1 g o más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad produciéndose una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna. El disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de volumen determinado.^(1,2)

En este tipo de cromatografía de líquidos clásica, la columna se usa una sóla vez y se desecha debido a que parte de la muestra usualmente se adsorbe en forma irreversible. Por lo tanto, el empacar una columna se debe repetir para cada separación, lo cual representa un gasto significativo de mano de obra y materiales. Así mismo, se requiere de un largo tiempo de análisis, que muchas veces pueden ser horas o incluso días.⁽²⁾

El problema principal de éste tipo de cromatografía es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna. En general, se utilizan algunas técnicas auxiliares como espectrofotometría, análisis químico o simplemente un registro gravimétrico para evaluar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla.⁽¹⁾

La cromatografía líquida de alta presión emplea columnas de diámetro muy reducido (por ejemplo 4 mm) rellenas de materiales especiales pulverizados cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30-40 μ m. Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, es decir, una gran caída de presión. Por esta razón, es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria

dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, entre 1 y 10 mg.⁽¹⁾

Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada se introduce la muestra a la cámara de inyección por medio de una jeringa; a presiones más elevadas se utilizan las válvulas de inyección.

Se coloca un detector a la salida de la columna para que proporcione un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

En este tipo de cromatografía, las columnas son reusables, lo que permite realizar cientos de separaciones y, además, tienen un escaso deterioro (aunque algunas veces es necesario regenerarlas). El flujo continuo resulta en una operación más reproducible, lo que significa mayor exactitud y precisión en los análisis.⁽²⁾

La cromatografía de líquidos requiere que la muestra se disuelva en la fase móvil y esto hace posible el análisis de compuestos de muy alto peso molecular; orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes.

B. CLASIFICACION.

Hay varias formas de realizar la cromatografía líquida de alta presión, cada una se basa en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra.⁽¹⁾

**Cromatografía Líquido-Líquido.*

El mecanismo de separación (o distribución) se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la fase 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, es decir, la separación es resultado de las diferencias de las solubilidades relativas de la muestra en la fase móvil y estacionaria.^(1,2)

Se utilizan materiales que contengan la fase estacionaria químicamente unida a un soporte, a modo de material de relleno de la columna; ésto evita la pérdida de fase estacionaria por su solubilidad en la fase móvil y la contaminación de la muestra con la fase estacionaria.⁽¹⁾

La cromatografía líquido-líquido se utiliza para compuestos moderadamente polares, de peso molecular inferior a 1500. Las columnas que comunmente se utilizan son de 15 a 50 cm de longitud y de 3 a 4 mm de diámetro interno. La caída de presión depende de muchas variables como la longitud, tamaño de las partículas del relleno, flujo de la fase móvil, temperatura, viscosidad, etc., y ésta caída puede ser de hasta 350 atm.⁽¹⁾

La naturaleza de la cromatografía líquido-líquido dicta que muestras polares se deben correr en columnas conteniendo fases estacionarias polares y viceversa.⁽⁵⁾

Los términos "cromatografía líquida de fase normal" y "cromatografía líquida de fase reversa", han evolucionado para diferenciar estas dos modalidades de operación. La cromatografía líquida de fase normal emplea una fase estacionaria polar y un solvente móvil no polar, mientras que la cromatografía de fase inversa emplea una fase estacionaria no polar y un solvente móvil polar.⁽⁵⁾

**Cromatografía Líquido-Sólido.*

El mecanismo de separación de la cromatografía líquido-sólido o de adsorción, se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos de la superficie de un sólido.⁽¹⁾ En ésta modalidad, una sustancia con una superficie activa es empacada dentro de la columna cromatográfica. Los empaques más comunes son alúmina y sílica gel. En el caso de ésta última, la estructura

contiene grupos silanoles polares.⁽⁵⁾(Figura no. 2)

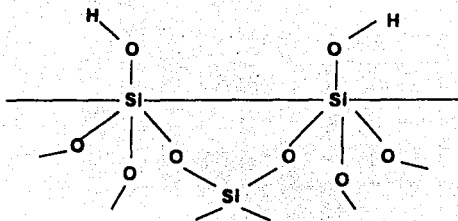


Figura No. 2 Grupos silanoles.

Esta cromatografía es muy útil y se aplica a moléculas de baja a media polaridad, de peso molecular no mayor de 1000. Las columnas comunmente utilizadas varían entre 15 y 25 cm de longitud y entre 2 y 3 mm de diámetro interno.⁽¹⁾

La actividad de la superficie de muchos sólidos se ve con frecuencia afectada por la retención de ciertas moléculas de alta polaridad como alcoholes, fenoles, agua, etc., y debido a ello en ocasiones es difícil reproducir los resultados obtenidos en los análisis porque las propiedades de la superficie han sufrido cambios, por éste motivo, la superficie de la sílice empleada es sometida a procesos de desactivación para disminuir la retención de moléculas muy polares.

**Cromatografía Líquida por Exclusión.*

Conocida también como cromatografía de permeación o cromatografía de filtración, efectúa la separación de acuerdo con el tamaño de las moléculas.⁽¹⁾

La columna se rellena con un gel cuyos poros son de tamaño similar al tamaño de las moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros y quedan retenidas en tanto que las grandes no.^(1,5) Así, las moléculas de tamaño grande se mueven a través de la columna rápidamente y las moléculas pequeñas son retenidas por el empaque.⁽²⁾ El intervalo de pesos moleculares con los que se puede trabajar varían de 500 e inclusive menos hasta varios millones. Las columnas empleadas pueden ser muy largas, de varios metros.^(1,5)

La cromatografía de filtración emplea materiales blandos, incapaces de resistir presiones mayores a 4 atm; la cromatografía de permeación, en contraste, emplea materiales de relleno semirígidos o rígidos y que pueden resistir presiones muy elevadas.⁽¹⁾

El mecanismo de separación es tal que el tiempo de elución o retención es inversamente proporcional al volumen de las moléculas en la fase móvil y por lo tanto proporcional al peso molecular.⁽¹⁾

**Cromatografía de Intercambio Iónico.*

La separación por intercambio iónico se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones.⁽¹⁾ El empaque de la columna contiene grupos polares ionizables como ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos o aminas cuaternarias. En el rango apropiado de pH, éstos grupos se ionizan y atraen sustancias con la carga opuesta.⁽⁵⁾

Este tipo de separación se aplica a compuestos de un intervalo de pesos moleculares muy amplio. Las columnas varían entre 25 y 50 cm de longitud y entre 3 y 4 mm de diámetro interno. Estas columnas son más largas que las utilizadas en otros tipos de cromatografía por la baja eficiencia de los materiales intercambiadores de iones.⁽¹⁾

Dos métodos adicionales de la cromatografía de líquidos resultan de la modificación de la cromatografía líquido-líquido: cromatografía de fase químicamente unida y la cromatografía de par iónico.⁽²⁾

- Cromatografía de Fase Químicamente Unida.

Esta técnica surgió como consecuencia de problemas asociados con la cromatografía líquido-líquido. Dado que su fase está químicamente unida a la superficie de un soporte, la fase móvil difícilmente produce deterioro alguno en la columna.⁽¹⁾

Si se varía la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria se pueden obtener diferentes tipos de selectividad. Estos grupos pueden ser de naturaleza polar como el grupo amino ($-NH_2$) y el grupo nitrilo ($-CN$) en el caso de la cromatografía de fase normal, o no polar como el grupo octilo ($-C_8H_{17}$), octadecilo ($-C_{18}H_{37}$), fenilo ($-C_6H_5$), etc. en el caso de cromatografía de fase inversa.⁽¹⁾

Debido a que es limitada la cantidad de fase estacionaria que es posible unir a la superficie de un soporte, los tamaños de muestra introducidos a la columna son necesariamente reducidos, por lo general, menor de 1 mg.⁽¹⁾

- Cromatografía de Par Iónico.

La cromatografía de par iónico puede ser considerada como una combinación de la cromatografía líquido líquido y la cromatografía de intercambio iónico.⁽²⁾

La popularidad de la cromatografía de par iónico proviene principalmente de las limitaciones de la cromatografía de intercambio iónico, y de la dificultad en el manejo de ciertas muestras por los otros métodos de cromatografía de líquidos (por ejemplo, compuestos que son muy polares y/o fuertemente ácidos o básicos).⁽²⁾

Grupos iónicos y ionizables pueden formar fuertes pares iónicos utilizando el ión de carga contraria adecuado. Así, los iones libres del soluto son solubles en el solvente más polar mientras el par iónico es soluble en la

fase menos polar.⁽⁶⁾

La cromatografía de par iónico se puede llevar a cabo en las modalidades de fase reversa y fase normal, siendo más comúnmente utilizada la fase reversa.⁽²⁾

El mecanismo de retención en cromatografía de par iónico se puede describir como:⁽³⁾

a) La formación de un par iónico entre el ión de la muestra y el agente formador del par iónico (ión de carga contraria) en la fase móvil, seguido de una asociación hidrofóbica del par iónico con la fase estacionaria de la columna, o,

b) Un proceso según el cual el agente formador del par iónico primero se adsorbe a la superficie de la fase estacionaria, y el ión de la muestra es entonces retenido por un mecanismo de intercambio iónico.

Existe un soporte considerable en la literatura para cualquiera de ambas posibilidades, una o la otra pueden ser utilizadas para explicar la cromatografía de par iónico.

La carga del ión de carga contraria depende en la del ión del soluto. Idealmente, el ión de carga contraria es univalente, aprótico y soluble en la fase orgánica, además, no debe interferir con el sistema de detección.⁽⁶⁾

C. PROCESO CROMATOGRÁFICO.

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en la distribución de los compuestos de una muestra entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cuando la mezcla de compuestos se adiciona a la fase móvil, cada uno de ellos establece equilibrios entre ambas fases, reteniéndose selectivamente en la fase estacionaria. Esto origina que el grado de movimiento de cada compuesto sea diferente y como resultado, los compuestos de la mezcla se separan.^(2,8)

Hay dos características ó factores que predominan durante el proceso de separación: la migración diferencial de varios compuestos (solutos) en la muestra original y la dispersión a lo largo de la columna de moléculas de cada soluto.(2)

La migración diferencial o movimiento individual de los compuestos, resulta de un equilibrio de distribución de los diferentes compuestos entre la fase móvil y la estacionaria. Entonces, la migración diferencial es determinada por aquéllas variables experimentales que afectan ésta distribución: la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria y la temperatura de separación.(2)

En la figura no.3, el compuesto A se mueve más rápidamente ya que su equilibrio esta desplazado hacia la fase móvil y sólo presenta una pequeña fracción de moléculas en la fase estacionaria, por lo tanto, abandona la columna primero; caso contrario para el compuesto B que abandona la columna al último al presentar un equilibrio desplazado hacia la fase estacionaria con una pequeña fracción de moléculas en la fase móvil. Como resultado, los compuestos A y B gradualmente llegan a ser separados. La migración diferencial es la base de la separación en cromatografía. Sin una diferencia en los valores de migración para dos compuestos, la separación no sería posible.(2)

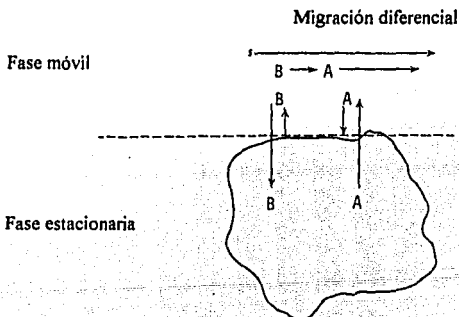


Figura No. 3 Migración diferencial.

La segunda característica de la separación cromatográfica, la dispersión

molecular, es resultado de las diferencias en los valores de migración para las moléculas de una muestra, las cuales no provienen de diferencias del equilibrio de distribución, sino que son el resultado de los siguientes procesos físicos:(2)

a) *Difusión de Eddy*: Se origina por los diferentes flujos microscópicos que la fase móvil sigue entre las diferentes partículas de la columna. Como resultado, las moléculas de la muestra toman diferentes caminos a través del empaque. Si el camino entre partículas es ancho, la fase móvil se moverá rápidamente, y si es estrecho, lentamente. Las moléculas que siguen el camino estrecho avanzan en la columna una distancia pequeña en un tiempo dado; las que van por el camino ancho recorren una mayor distancia. Así, como resultado de ésta difusión de Eddy, vemos una dispersión de moléculas. Esta dispersión llega a ser progresivamente más grande a medida que la fase móvil atraviesa la columna.

En la figura no. 4a, se muestra el efecto de la difusión de Eddy sobre las moléculas de una muestra.

b) *Transferencia de masa en la fase móvil*: Este proceso físico se refiere a las diferencias originadas en el flujo al pasar entre dos partículas vecinas. La fase móvil adyacente a la partícula se mueve lentamente, mientras que la fase móvil en el centro de la corriente se mueve rápidamente. Como resultado, las moléculas de la muestra cercanas a la partícula se mueven una distancia corta y las moléculas a la mitad de la corriente se mueven mayor distancia. Nuevamente esto resulta en una dispersión de moléculas a lo largo de la columna.

En la figura no. 4b, se muestra la transferencia de masa en la fase móvil.

c) *Transferencia de masa en la fase móvil estancada*: Las partículas del empaque de la columna presentan poros, la fase móvil contenida dentro de éstos poros se encuentra estancada o inmóvil. En la figura no. 4c, se muestra el poro de una partícula. Las moléculas de la muestra se mueven dentro y fuera de éstos poros por difusión. Las moléculas que sufren una difusión a corta distancia hacia adentro y luego hacia afuera del poro, regresan rápidamente a la fase móvil y se desplazan una cierta distancia dentro de la columna. Las moléculas que se difunden una mayor distancia dentro del poro, pasan más

tiempo dentro de él y menos tiempo en la fase móvil; entonces, éstas moléculas se mueven una menor distancia dentro de la columna.

d) *Transferencia de masa en la fase estacionaria:* Después de que las moléculas de la muestra se difunden dentro del poro, éstas penetran a la fase estacionaria y llegan a interaccionar con ella. Si las interacciones son muy fuertes, las moléculas pasarán mayor tiempo dentro de la partícula y se desplazarán una corta distancia dentro de la columna; en contraste, las moléculas con una interacción menor, no se retienen tanto tiempo y se desplazan una mayor distancia dentro la columna. Figura no. 4d.

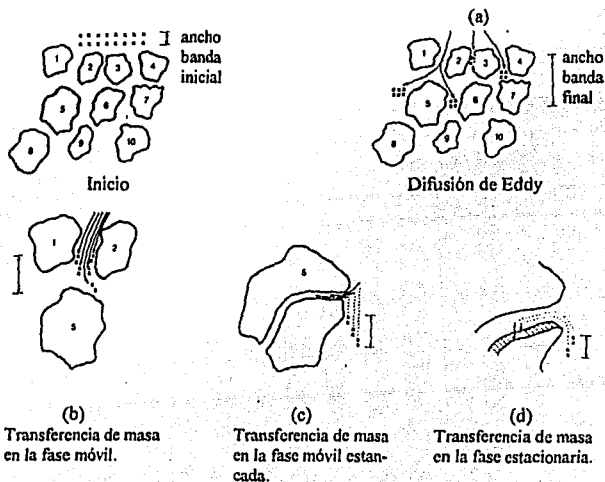


Figura No. 4 Dispersión molecular.

D. VENTAJAS Y LIMITACIONES.

Al igual que toda técnica analítica la cromatografía de líquidos moderna tiene sus ventajas y algunas limitaciones:(1,2)

Ventajas:

1. *Diversidad de aplicación:* Al cumplir con los requerimientos de que la muestra sea soluble en la fase móvil y que la fase estacionaria sea la adecuada para la separación de los componentes de la muestra, se obtiene una gran diversidad en la aplicación de ésta técnica analítica pudiendo analizarse compuestos orgánicos como inorgánicos, muestras de peso molecular bajo ó alto, sustancias líquidas o sólidas, iónicas o covalentes.

2. *Velocidad de análisis:* Con ésta técnica se pueden obtener separaciones en términos de minutos, utilizando columnas de alta eficiencia y sistemas de bombeo de alta presión que originen flujos rápidos y constantes de fase móvil.

3. *Alta resolución:* Es posible obtener una alta resolución que permite separar mezclas muy complejas, como por ejemplo cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.

4. *Resultados cuantitativos:* Los métodos de cromatografía líquida proporcionan muy buena información de tipo cuantitativo, siendo posible efectuar con facilidad análisis cuya precisión suele ser mejor del 1%.

5. *Sensibilidad:* La sensibilidad es un parámetro que nos da idea de la cantidad mínima detectable. Los detectores comúnmente empleados proporcionan alta sensibilidad ya que pueden detectar hasta nanogramos; otros más especializados pueden detectar cantidades tan pequeñas como picogramos.

6. *Automatización:* Actualmente la automatización nos permite realizar análisis completos de la muestra desde su introducción en el cromatógrafo

hasta la impresión de los resultados. La identificación de cada señal se realiza comparando los tiempos de retención con valores previamente determinados para soluciones estándar y la cuantificación se obtiene midiendo las áreas y/o alturas integradas de las señales de acuerdo con el método analítico seleccionado. La automatización ha sido posible gracias a la introducción de microprocesadores electrónicos.

Limitaciones:

Cabe ahora mencionar, para tener una idea más realista, las limitaciones de la cromatografía de líquidos de alta resolución. El instrumental es costoso, no existe aún un detector universal y sensible, el detector de índice de refracción es de respuesta universal pero de limitada sensibilidad, por otro lado, el detector de luz ultravioleta es sensible, pero su respuesta es selectiva.

Otra limitación importante es la necesidad de que el personal que utiliza ésta técnica tenga capacitación y experiencia en su aplicación para ser un operador eficiente.

E. DEFINICIONES.

El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos característicos de ésta técnica instrumental, a continuación se dan los más utilizados indicando la forma en que son evaluados (figura no. 5):⁽¹⁾

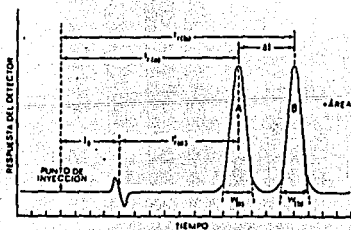


Figura No. 5 Cromatograma típico.

1. *Tiempo de retención (tr)*: El tiempo de retención se mide desde el momento en que la muestra se introduce al sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico; es decir, es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna. El tiempo de retención, para un sistema en especial, es característico de la muestra, columna, fase móvil y temperatura; debido a esto, se ha venido utilizando para identificar compuestos ya que bajo las mismas condiciones es reproducible.^(1,2,5)

2. *Tiempo muerto (to)*: Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien, de un solvente orgánico no retenido.⁽¹⁾

3. *Tiempo de retención ajustado (tr')*: Es la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto; es una medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el empaque de la columna. Dicho de otra manera, el tr es el tiempo total de permanencia en la columna, to el tiempo que la muestra permanece en la fase móvil y, tr' es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.^(1,2)

$$tr' = tr - to$$

4. *Número de platos teóricos (N)*: Un plato teórico equivale a un equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los platos teóricos son una medida de la eficiencia de la columna, y es así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna, por ello:⁽¹⁾

$$N = 16 (tr / W)^2$$

$$N = 5.54 (tr / W_{1/2})^2$$

donde:

tr = tiempo de retención.

W = ancho del pico a la altura de la línea base.

W_{1/2} = ancho del pico a la mitad de su altura.

5. *Altura equivalente a un plato teórico (AEPT)*: Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria; es decir, un equilibrio de distribución. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos por unidad de

longitud y, por lo tanto, la columna será más eficiente.⁽¹⁾

$$AEPT = L / N$$

donde:

L = Longitud de la columna en metros.

N = Número de platos teóricos.

6. *Factor de capacidad (K')*: También se le conoce como coeficiente de distribución o de reparto. Es una propiedad física de cada sustancia que mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Este valor nos indica que tanto puede retenerse cada componente de una muestra en la columna. Un valor de K' entre 2 y 10 es deseable en general.^(1,5,9)

$$K' = t_r' / t_o = (t_r - t_o) / t_o$$

7. *Selectividad (α)*: Es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. De acuerdo a la interacción que haya entre un compuesto y otro con respecto a la fase estacionaria, se realizará una selección de que pico o compuesto sale primero y cual al final. Si el valor de $\alpha = 1$ quiere decir que los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realizará la separación. Entonces, entre más elevados sean los valores de α , mayor selectividad de la fase estacionaria y una mejor separación. La selectividad está determinada por:^(1,9)

$$\alpha = K' b / K' a$$

8. *Resolución (R)*: Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos:

$$R = 2 (t_r b - t_r a) / W_a + W_b$$

donde:

$t_r b$ = tiempo de retención para el pico b.

$t_r a$ = tiempo de retención para el pico a.

W_a = ancho del pico a a la altura de la línea base.

W_b = ancho del pico b a la altura de la línea base.

1.2 INSTRUMENTAL

A. CARACTERISTICAS GENERALES.

En todo tipo de instrumental hay ciertas características de índole general que deben evaluarse, dichas características son:(1,2)

1. *Versatilidad*: El instrumento debe tener la capacidad para resolver y trabajar con muestras de diferente tipo, prestarse a las distintas técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones como: programación de fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna, etc. Para ello, el instrumento deberá estar equipado con:

- Sistema de operación de alta presión.
- Diversos detectores.
- Programadores de fase móvil.
- Controles de temperatura para la columna y detector.
- Controles de flujo.
- Materiales químicamente resistentes.

2. *Rapidez*: Para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno para columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.

3. *Reproducibilidad y estabilidad*: Son características esenciales si se quiere obtener un funcionamiento efectivo del instrumento a largo plazo. El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación tales como, flujo de la fase móvil, temperatura, presión, composición de la fase móvil, respuesta del detector, etc.

4. *Sensibilidad*: Un buen instrumento, además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciable. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza.

B) PARTES QUE LO CONSTITUYEN.

A continuación se presenta un esquema básico de un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución:⁽¹⁾

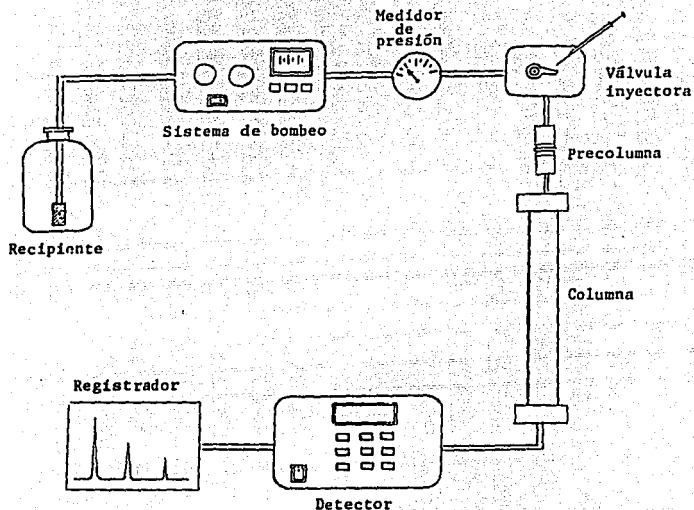


Figura No. 6 Instrumental para cromatografía líquida de alta resolución.

1. **Fase móvil:** Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma son muy importantes. Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía de líquidos son:^(1,2)

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.
- Tener alta pureza.

Para el depósito de fase móvil se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plástico inertes. La toma del disolvente se hace generalmente a través de un filtro que tiene por objeto remover pequeñas partículas que pueden obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna. De ser posible, el recipiente debe estar acondicionado para que pueda desgasificarse la fase móvil ya que en ocasiones, en especial las fases móviles polares, tienen una marcada tendencia a atrapar oxígeno y otros gases. Si éstos gases provocan burbujas dentro del instrumento pueden afectar seriamente la estabilidad del sistema, el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna.

2. Sistemas de bombeo: Debido a que las columnas están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas ofrecen una gran resistencia al flujo de la fase móvil. Por ésta razón, se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable (1). La función de la bomba en cromatografía de líquidos es la de proveer un suministro de fase móvil constante y reproducible hacia la columna (2).

Los requerimientos generales para los sistemas de bombeo son:

- El sistema debe estar hecho con materiales químicamente resistentes a la fase móvil (2).
- Capacidad para trabajar a altas presiones (hasta 5000 psi) (1).
- Intervalo de volumen amplio (entre 0.1 y 10 ml).
- Flujo reproducible y constante.
- Facilidad para limpiar el sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar dos tipos de bombas:(1)

a) Bombas mecánicas.

- Bombas recíprocas (pistón o diafragma)

- Bombas de desplazamiento continuo.

b) Bombas neumáticas.

La figura 7 a,b, y c muestra en forma esquemática cada uno de éstos tipos de bombas.

a) Bombas mecánicas:

- Bombas recíprocas: Estas bombas desplazan flujos de volumen constante en forma no continua. La manera en que operan es mediante el movimiento de un pistón o diafragma, y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y cierran; así, se llena y se vacía, de modo alternativo, una pequeña cámara. (1).

La mayor desventaja de éste tipo de bomba es la pulsación en su funcionamiento; es decir, el flujo se obtiene en forma de pulsos y no en forma constante y uniforme (1,5). Lo anterior puede causar pérdida en la eficiencia de la columna e inestabilidad del detector (1).

Uno de los métodos utilizados para eliminar el problema de la pulsación ha sido la adición de pistones. Por la adición de un segundo pistón, la pulsación se reduce ya que mientras un pistón succiona la fase móvil el otro expulsa la fase móvil fuera de la bomba (1,5).

- Bombas de desplazamiento continuo: Llamadas también bombas de émbolo o bombas de tipo jeringa. En éstas bombas, un émbolo es desplazado en forma continua y uniforme comprimiendo el líquido contenido en una cámara de cierto volumen; el líquido fluye a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad (1).

El flujo de éstas bombas es libre de pulsaciones, pero su mayor inconveniente es que la capacidad de la bomba es limitada y, para llenar nuevamente la cámara es necesario suspender su operación (1,5).

b) Bombas neumáticas: En este sistema el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea sobre el mismo líquido o sobre el recipiente comprimible que lo contiene (1).

Las desventajas de éstas bombas son la difusión que presenta el gas sobre el líquido, y ésto, problemas de burbujas en el detector. Este problema puede resolverse colocando a su vez una interfase que impida el contacto directo del líquido con el gas. Otra desventaja es la capacidad limitada en el volumen que pueden bombear (1,5).

Sea cual sea el tipo de bomba empleado, es conveniente colocar un filtro entre la bomba y la cámara de inyección para evitar que partículas extrañas bloqueen el sistema (1).

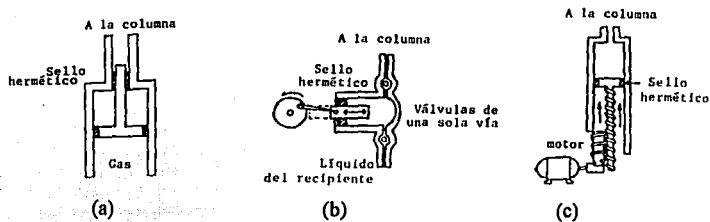


Figura No. 7 Tipos de bombas.

3. **Sistemas de inyección:** Esta parte del instrumento exige cuidadoso diseño ya que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil (1).

Hasta hace poco tiempo, la introducción de la muestra se efectuaba mediante una jeringa de muy pequeña capacidad, muy similar a como se realiza

en los cromatógrafos de gases, con la cual se inyecta la muestra dentro de una pequeña cámara donde posteriormente es disuelta y arrastrada por la fase móvil.

Otro mecanismo que se utiliza para introducir la muestra en el sistema es por medio de válvulas inyectoras, donde la muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción de tubo capilar de acero inoxidable o teflón (figura 8). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la posición de entrada y salida se invierte, así, la muestra es disuelta y arrastrada por la fase móvil inyectándola a la columna.^(1,11)

De este modo, se logra inyectar a cualquier presión un intervalo muy amplio de tamaños de muestra con un alto grado de reproducibilidad.

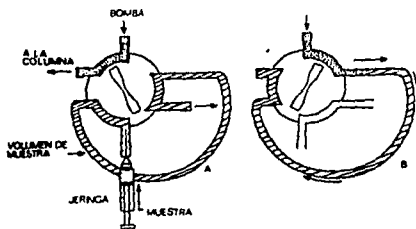


Figura No. 8 Válvula inyectora.

4. **Precolumnas:** Consisten por lo general de una sección corta de tubo, rellena de algún soporte sólido poroso, de preferencia igual que el de la columna pero con un tamaño de partícula mayor; a través de la cual se hace pasar la fase móvil y la muestra antes de que se introduzcan a la columna. Sirven para proteger y alargar la vida de la columna.⁽⁹⁾

Para conservarlas es fundamental operar en condiciones adecuadas, emplear solventes idóneos con óptimas propiedades de pureza física y química, así como filtrar todas las fases móviles empleadas.⁽¹²⁾

5. **Columnas:** En todo sistema cromatográfico, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de una muestra a analizar.⁽¹⁾

La columna básicamente consiste de un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones, con paredes finamente pulidas. La longitud de la columna es, por lo general, entre 10 y 50 cm; su forma es de preferencia recta ya que existe una pérdida de la eficiencia cuando se doblan las columnas.

Las conexiones deben ser herméticas y tener un volumen muy pequeño. En los extremos de la columna se coloca un disco de teflón o metal poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o pierda.

En cuanto al empaque, las dimensiones de las partículas de los materiales empleados deben ser muy pequeñas, pudiendo ser de forma regular o irregular. Se dice que el material ideal es aquél que, en el menor tiempo posible, da la mejor resolución para la separación de la mezcla, tiene la máxima capacidad de muestra, es fácil de introducir a la columna, produce caídas de presión pequeñas y además, es de costo reducido.^(1,12)

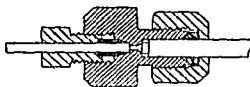


Figura No. 9 Extremo de una columna.

6. **Detectores:** Una parte integral de cualquier sistema de cromatografía de líquidos es el detector al final de columna. El detector debe estar diseñado de tal manera que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra y, además, genere una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que ésta sale de la columna.⁽¹⁾

Al considerar un detector, deben tenerse en cuenta algunas propiedades:

Respuesta: Puede ser universal o selectiva de acuerdo a la capacidad del

detector para trabajar con muestras de todo tipo o sólo de uno específico.

Sensibilidad: Se define como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. Este término es relativo ya que a partir de un mismo detector, la señal obtenida puede ser muy diferente para diversas muestras. Es deseable que tenga una alta sensibilidad.

Ruido: Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra; puede ser producida por variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire en el detector, etc.

Linealidad: Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, ésta debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.

Estabilidad: Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo, a la vez que ser compatible con programaciones de fase móvil.

Volumen muerto: El volumen de la celda del detector debe ser muy pequeño para evitar la pérdida de eficiencia, de preferencia debe ser menor a 10 μl .

A continuación se describen los detectores de uso más frecuente:

a) *Detector de índice de refracción:*⁽¹⁾ Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. (Figura no. 10).

La respuesta de éste detector es universal ya que cada compuesto tiene su índice de refracción propio. Su sensibilidad es moderada ya que depende de la diferencia entre el índice de refracción del soluto y el índice de refracción de la fase móvil; por lo general, del orden de microgramos o partes por millón.

Desafortunadamente, es sensible a las variaciones de de flujo y temperatura. Estos detectores no son instrumentos de fácil manejo, por lo que se ha limitado su uso.

De todo lo anterior se desprende que el detector de índice de refracción es un detector de respuesta universal, que requiere compensación por el disolvente, que es moderadamente sensible y que no destruye la muestra. Su estabilidad es buena, es sensible a los cambios de temperatura y de flujo y la señal que genera puede ser positiva o negativa según si el índice de refracción de la solución que contiene la muestra es mayor o menor que el índice de refracción del disolvente.

b) *Detector de luz ultravioleta:*^(1,3,11) Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta.

La respuesta de este detector es selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta:

- Detector de longitud de onda fija: Es relativamente insensible a los cambios de flujo y temperatura. En condiciones óptimas se pueden obtener sensibilidades de hasta 0.005 unidades de absorción, y si el compuesto absorbe intensamente en el ultravioleta, es posible detectar cantidades de muestra del orden de 2 nanogramos.

La mayor parte de los diseños operan a una longitud de onda de 254 nm, aunque la mayoría de los instrumentos presentan la posibilidad de operar a 4 ó 5 longitudes de onda mediante el uso de otros filtros.

Es un equipo sencillo, económico y, además, el 60% de los compuestos orgánicos presentan alguna absorción a 254 nm.

- Detector de longitud de onda variable: Estos detectores utilizan monocromadores o rejillas de difracción que les permiten operar desde 200 hasta 800 nm y por ello, permiten la detección del 90% de los compuestos orgánicos. (Figura no. 11).

Estos detectores presentan algunas ventajas sobre los detectores de longitud de onda fija:

- Es posible seleccionar la longitud de onda óptima para la muestra.
- Pueden evitarse algunos problemas de la fase móvil (absorción excesiva).
- Algunos diseños permiten obtener el espectro de absorción de cada compuesto por separado.

En ambos tipos de detectores, la pureza espectroscópica de la fase móvil puede ser muy importante, especialmente cuando se efectúa la detección a longitudes de onda corta (220 nm); se recomienda el uso de disolventes grado cromatográfico en vez de los grado espectroscópico porque estos últimos suelen contener conservadores que afectan las separaciones.

Las celdas deben de ser de un volumen pequeño con el objeto de evitar un ensanchamiento de las bandas de elución.

La mayor desventaja de estos diseños consiste en su elevado costo.

Los detectores de luz ultravioleta son los más sensibles y de uso más generalizado en cromatografía líquida.

c) *Detector de arreglo de diodos:* La mayor limitación de los detectores UV/VIS de longitud de onda fija y variable es que solamente puede ser monitoreada una longitud de onda en particular a un tiempo dado para un análisis dado.

Con el desarrollo del detector de arreglo de diodos la adquisición del espectro de un soluto puede realizarse en milisegundos. Se puede checar la

homogeneidad de un pico cromatográfico por el espectro a diferentes secciones del pico. Aún más, la pureza de un pico cromatográfico puede ser probada por la absorbancia a dos o más longitudes de onda, características como una función del tiempo. Compuestos desconocidos pueden ser identificados comparando los espectros de los picos con los estándares. (Figura no. 12).

El equipo de cromatografía de líquidos con un detector UV/VIS de arreglo de diodos es una herramienta invaluable; ayuda a optimizar las longitudes de onda para una detección más sensible, identificaciones más específicas y una cuantificación más exacta.

d) *Detector de fluorescencia:*^(1,11) Aproximadamente 20% de los compuestos orgánicos fluorescen, es decir, emiten luz de cierta longitud de onda al encontrarse en estado excitado.

En la actualidad es el detector más sensible de que se dispone. En condiciones buenas es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de picogramos.

Este detector puede ser de diseño simple, su manejo requiere de cierto cuidado y su mayor ventaja es su alta selectividad de respuesta y su sensibilidad.

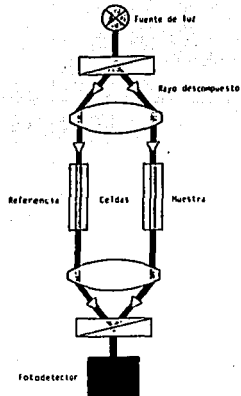


Figura No. 10 Detector de índice de refracción.

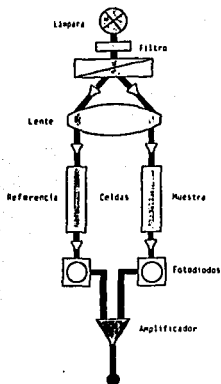


Figura No. 11 Detector de luz ultravioleta de longitud de onda variable.

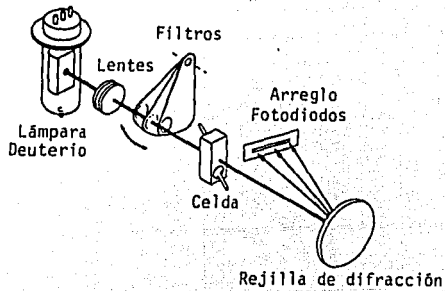


Figura No. 12 Detector de arreglo de diodos.

2. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. (7)

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de análisis apropiados.

Parte integral de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

La validación del método puede definirse como el proceso para el cual queda establecido, mediante estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad.

DEFINICIONES.

A. *Linealidad*: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Los resultados analíticos pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática.

La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 concentraciones y haciendo el análisis por duplicado para cada concentración. El coeficiente de variación (C.V.) debe ser menor o igual a 1.5%, el coeficiente de correlación (r) = 0.99 y el coeficiente de determinación (r^2) = 0.98.

La linealidad del método se determina a partir de doce placebos adicionados preparados a 6 diferentes concentraciones correspondientes al 70, 80, 90, 100, 110 y 120% de la solución estándar considerada como el 100%. Se

calcula la media, desviación estándar relativa y límites de confianza al 95%; $r = 0.99$, $r^2 = 0.98$, la pendiente deberá encontrarse entre 0.98 y 1.02, y el intercepto deberá encontrarse entre +/- 2% de la cantidad etiquetada.

B. Exactitud: La exactitud es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

La exactitud se determina aplicando el método a muestras preparadas con mezclas de los excipientes (placebos) a los cuales se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés, por arriba y por abajo de la concentración normal esperada en la muestra. La media de recobro debe estar entre 98.5% y 101.5% y el coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5%.

C. Precisión: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

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

1. **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema. El coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5%.

2. **Reproducibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes realizadas bajo

condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando diferentes equipos).

Se determina de una muestra homogénea del producto, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado. El coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5%.

D. Límite de detección: Es la mínima concentración de una sustancia la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas. Se expresa por la concentración de la sustancia de interés presente en la muestra; mg/ml, mg/g, etc.

Un estimado del límite de detección es determinado como la respuesta igual a 2 veces el nivel de ruido de las mediciones, bajo las condiciones normales de operación del método analítico.

E. Límite de cuantificación: Es la mínima concentración de una sustancia que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

El límite de cuantificación es estimado como 5 veces la concentración mínima detectable ó, como la respuesta igual a 10 veces el nivel de ruido de las mediciones. También suele evaluarse analizando un número adecuado de muestras de concentración conocida en el rango de 0 al 5% de la solución estándar considerada como el 100%, con un mínimo de 4 puntos que deben ensayarse. Con la información obtenida, se grafican los resultados de respuesta contra concentración. Se determinará el nivel de ruido el cual se interpolará y el punto en el cual se intercepte con el límite inferior de confianza al 95%, en el eje de las X, es el límite de cuantificación o de detección. El coeficiente de correlación de la regresión debe ser mayor o igual a 0.99.

F. Especificidad: Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes.

Se determina comparando los resultados obtenidos de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o los ingredientes del placebo, con los obtenidos de muestras que no contienen estas posibles interferencias. Si no se cuenta con un protocolo para establecer la especificidad del método analítico, ésta debe ser establecida forzando la degradación del fármaco usando ácido, álcali, agentes oxidantes y luz intensa.⁽²³⁾

G. Tolerancia: La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferentes temperaturas, columnas, sistemas de elución, condiciones ambientales, etc.

La evaluación de la tolerancia mide la habilidad del método para obtener resultados confiables aún teniendo pequeñas variaciones en los parámetros del método.⁽²³⁾

Para la preparación de muestras y estándares, variables como la cantidad de muestra y estándar pesado, los volúmenes usados, el tiempo de agitación requerido para la efectiva extracción del fármaco, optimización del solvente para la preparación de las muestras, etc., deben tomarse en cuenta. Para el análisis, la longitud de onda y velocidad de flujo utilizados, el pH, la fuerza iónica, etc., también son variables a considerar; entre otros.

H. Estabilidad de la muestra: Es la propiedad de una muestra de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Considerando la variedad de métodos existen diferentes esquemas de validación.⁽¹⁵⁾ Las categorías más comunes de métodos analíticos que requieren validarse son:

Categoría I: Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas límite.

Categoría III: Métodos analíticos para determinar características físicas (por ejemplo, disolución, liberación del principio activo, etc.).

Para cada categoría se requiere diferente información analítica. La tabla I enlista los datos que son requeridos para las diferentes categorías.

TABLA I.

Parámetro analítico.	Categoría II			
	Categoría I	Análisis cuantitativos.	Pruebas límite.	Categoría III
Precisión	si	si	no	si
Exactitud	si	si	*	*
Límite de detección	no	no	si	*
Límite de cuantificación	no	si	no	*
Especificidad	si	si	si	*
Linealidad	si	si	no	*
Tolerancia	si	si	*	si
Estabilidad de la muestra	si	si	si	si

* Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de un ensayo en específico.

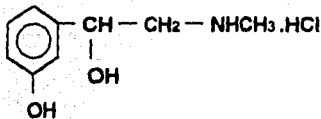
3. CLORHIDRATO DE FENILEFRINA.

A. MONOGRAFIA. (13,14,15,16,17,18,19)

1. Descripción:

- Nombre, fórmula y peso molecular:

El clorhidrato de fenilefrina es: Clorhidrato de alcohol bencílico 1-*m*-hidroxi- α -[(metilamino) metil]. También se le conoce como clorhidrato de 1- α -hidroxi- β -metilamino-3-hidroxi-1-etilbenceno; bencenometanol; clorhidrato de *m*-metilaminooctanolfenol; clorhidrato de 3- hidroxi- α -[(metilamino) metil]; clorhidrato de neo sinefrina; adrianol; neofrin, lexatol.



$C_9H_{14}ClNO_2$

PM 203.67

- Apariencia, color, olor:

Cristales blancos o prácticamente blancos, inodoros y con sabor amargo.

2. Propiedades físicas:

- Punto de fusión:	Clorhidrato de fenilefrina	140-145°C
	Fenilefrina base	170-177°C

- Solubilidad: Facilmente soluble en agua y en alcohol. Prácticamente insoluble en éter y cloroformo.

- pK: pK₁: 8.77
 pK₂: 9.84

- Rotación óptica: $[\alpha]_D^{25} = -46.2$ a -47.2°

4. *Pérdida por secado*: No más del 1% de su peso. Secar a 105°C durante dos horas.

5. *Residuo de la ignición*: No más del 0.2%.

6. *Sulfatos*: Una solución que contenga 50 mg de la muestra de clorhidrato de fenilefrina en 25 ml de agua, no muestra más turbidez que la que corresponde a 0.10 ml de solución 0.02N de ácido sulfúrico, 0.20 por ciento.

7. *Cetonas*: En un mililitro de agua disolver 200 mg de la muestra de clorhidrato de fenilefrina y agregar 2 gotas de SR de nitroferrocianuro de sodio, 1 ml de solución de hidróxido de sodio 0.1N, seguido de 0.6 ml de ácido acético glacial. La solución final no tiene más color que el producido en la solución de control preparada con 1 ml de acetona diluida 1 en 2000.

8. *Contenido de cloruros*: En 5 ml de agua disolver cerca de 300 mg de la muestra de clorhidrato de fenilefrina, agregar 5 ml de ácido acético glacial y 50 ml de metanol. Enseguida agregar SI de eosina Y y valorar con solución 0.1N de nitrato de plata.

Cada ml de solución 0.1N de nitrato de plata consumido, es equivalente a 3.545 mg de Cl. Se encuentra no menos del 17.0% y no más del 17.7% de Cl, calculado sobre la sustancia seca.

9. Ensayos de identidad:

- Espectro de absorción IR: Una dispersión de la muestra de clorhidrato de fenilefrina en bromuro de potasio exhibe máximas únicamente a las mismas longitudes de onda, de una preparación similar con la SRef de clorhidrato de fenilefrina.

- Espectro de absorción U.V.: Obtener el espectro de absorción en el rango ultravioleta de la solución de referencia y de la solución muestra empleando celdas de 1 cm y solución de ácido sulfúrico como blanco (1:350).

- A 1 ml de solución 1 en 100 de la muestra de clorhidrato de fenilefrina, agregar una gota de SR de sulfato cúprico y 1 ml de una solución 1 en 5 de hidróxido de sodio. Se produce una coloración azul. A la solución así obtenida agregar 1 ml de éter y agitar fuertemente. La capa etérea no adquiere coloración azul.

10. Métodos de análisis:

- Análisis espectrofotométrico directo: La banda de absorción ultravioleta a 272 nm se debe a la estructura fenólica. La absorbancia puede ser utilizada para cuantificar fenilefrina directamente o después de su extracción.

- Cromatografía en papel: La cromatografía en papel ha sido utilizada para aislar fenilefrina de sus productos de descomposición y de otros simpaticomiméticos. Se han utilizado sistemas como *n*-butanol/ácido acético/agua (4:5:1), *n*-butanol/ácido acético/agua (5:1:3), fenol conteniendo 15% v/v de HCl 0.1N, butanol/tolueno/ácido acético/agua (100:100.50:50), alcohol bencílico/ácido acético/agua (5:2:5); con reveladores como ninhidrina e indofenol.

- Cromatografía líquido-líquido:(21)

Fase móvil: Preparar una mezcla de metanol y agua (1:1) conteniendo 1.1 g de 1-octansulfonato de sodio por litro, ajustar el pH a 3.0 con ácido fosfórico, filtrar y desgasificar. Hacer ajustes a la proporción de metanol y agua, si es necesario.

Solvente de dilución: Preparar una mezcla de metanol y agua (1:1), y ajustar el pH a 3.0 con ácido fosfórico.

Preparación del estándar: Disolver una cantidad pesada con exactitud de clorhidrato de fenilefrina USP SR en solvente de dilución para obtener una solución stock con una concentración conocida de aproximadamente 2 mg por ml. Diluir un volumen medido con exactitud de ésta solución con solvente de dilución para obtener la preparación del estándar teniendo una concentración conocida de aproximadamente 0.1 mg / ml.

Preparación de la muestra: Transferir un volumen medido con exactitud de la solución nasal, de manera que la concentración final sea aproximadamente igual a la de la solución estándar.

Sistema cromatográfico: El cromatógrafo de líquidos esta equipado con un detector a 280 nm y una columna de 4.6 mm x 25 cm que contiene empaque octadecil silano, con un tamaño de partícula de 3 a 10 μm . La velocidad de flujo es de 1 ml por minuto.

Procedimiento: Por separado inyectar volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la solución estándar y de la muestra, obtener los cromatogramas y medir la respuesta para los picos mayores. Calcular la cantidad, en mg, de $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$ en cada ml de la solución nasal tomando la fórmula:

$$100 (C/V)(r_U/r_S),$$

donde C es la concentración, en mg / ml, de clorhidrato de fenilefrina USP SR en la solución estándar, V es el volumen de dilución, en ml, de la solución nasal, r_u y r_s son las respuestas de los picos obtenidas de la muestra y del estándar, respectivamente.

11. *Estabilidad, productos de degradación:* El clorhidrato de fenilefrina es estable como sólido. El compuesto es estable por abajo de un pH de 7.0. Por arriba de pH 7.0, ocurre degradación y aparentemente involucra la cadena lateral con pérdida de la función amino secundaria. El grupo fenólico permanece intacto. Los productos de degradación no han sido identificados, pero el 5-hidroxi-N-metilindoxil ha sido propuesto. La presencia de metales pesados, especialmente el cobre, catalizan la velocidad de degradación.

Shriftman⁽²⁷⁾ encontró de 12 a 28% de descomposición en soluciones no amortiguadas de fenilefrina en una semana a varias temperaturas. También encontró aproximadamente 5 productos de descomposición. La función amino secundaria no estaba presente en por lo menos uno de los productos.

Fagard⁽²⁸⁾ encontró que soluciones de fenilefrina eran estables en frascos ambar; daban 1% de descomposición después de 11 días en botes de polietileno de baja densidad y una descomposición de 81% cuando se almacenaron por 130 días en botes de nylon.

B. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.(20, 22, 26)

La farmacología del sistema nervioso autónomo comprende una serie de sustancias que imitan o se oponen a los efectos producidos por los impulsos nerviosos de este sistema, es decir, estos fármacos estimulan o deprimen las estructuras inervadas por el sistema simpático y parasimpático.

La fenilefrina pertenece al grupo de los fármacos adrenérgicos o simpaticomiméticos con efecto principalmente sobre los receptores α -adrenérgicos, es decir, imitan los efectos producidos por la estimulación de las fibras adrenérgicas posganglionares. La estimulación central es mínima y su administración aumenta la presión sistólica y diastólica.

La estructura fundamental responsable de la acción simpaticomimética es la cadena o radical aromático, unido a una cadena lateral amina, alifática. El poseer el hidroxilo fenólico en posición meta hace que tenga efectos alfa-preponderantes.

De acuerdo a la clasificación de los fármacos adrenérgicos o aminas simpaticomiméticas, la fenilefrina corresponde al grupo de las fenolaminas. Estas, actúan sobre el sistema respiratorio como broncodilatadoras.

Las fenolaminas, son estables y, no se inactivan en el hígado. Tarda de 10 a 15 minutos en actuar y la administración subcutánea o intramuscular es efectiva durante una hora.

La fenilefrina posee interacciones medicamentosas con los fármacos antihipertensivos, refiriéndose a la guanetidina con la que existe supersensibilidad, con aumento de la acción presora y midriática. No debe administrarse cuando se ha tratado previamente a los pacientes con inhibidores de la monoamino-oxidasa, reserpina, metildopa o antidepresores tricíclicos.

C. PROPIEDADES TOXICOLÓGICAS.⁽²²⁾

En general, las fenolaminas producen reacciones adversas con menor frecuencia que las catecolaminas (otro de los grupos de fármacos adrenérgicos, muy activos y potentes); y estas reacciones pueden ser locales o generales, especialmente cardiovasculares.

Las reacciones locales que a veces ocasionan empleándolas por infusión intravenosa cuando se produce extravasación, son poco frecuentes y de carácter inflamatorio.

Las manifestaciones cardiovasculares consisten en una elevación excesiva de la presión arterial, con cefalea y palpitaciones. La hipertensión cede disminuyendo la dosis, lo mismo que las arritmias.

En el caso específico de la fenilefrina, las reacciones adversas o efectos colaterales son un reflejo de su acción adrenérgica; los más comunes son: aumento en el ritmo cardiaco, cefalea, insomnio, nerviosismo, escurrimiento y obstrucción nasal. En el caso de sobredosis con fenilefrina, los síntomas son: dolor de cabeza, palpitaciones, taquicardia, vómito, aumento en la presión arterial y el pulso es lento y débil. No se recomienda su uso durante el embarazo.

No deberá administrarse por periodos mayores de tres semanas. El uso prolongado y excesivo puede inducir taquifilaxis y reincidencia de la congestión.

Su uso en niños deberá limitarse al tiempo más corto y a la dosis más pequeña.

Aunque no se ha observado supresión adrenal o atrofia de la mucosa nasal en los estudios clínicos, el riesgo potencial de estos efectos deberá ser considerado al usarse por periodos prolongados y en cantidades excesivas.

IV. PARTE EXPERIMENTAL.

1. Determinación cuantitativa de clorhidrato de fenilefrina.

A. Material.

Matraz volumétrico de 100 y 50 ml.

Pipeta volumétrica de 2 y 4 ml.

Membrana de filtración tipo HA (acuosa) de 0.45μ y GVWP (orgánica) de 0.22μ , Millipore.

B. Equipo de laboratorio.

Balanza analítica Sartorius, modelo 1712.

Balanza granataria Mettler, modelo 2000.

Potenciómetro Beckman, Φ -45.

Baño de ultrasonido Branson, modelo 5210.

Soporte para membrana de filtración Millipore, modelo OM-39.

Agitador Vortex Thermolyne, modelo 16700.

Agitador magnético Corning, modelo PC-320.

C. Reactivos.

Metanol grado cromatográfico, Mallinckrodt.

Agua grado cromatográfico, Milli-Q reagent system.

Acido acético glacial, R.A., J.T. Baker.

Clorhidrato de fenilefrina, estándar de referencia.

Metronidazol, estándar interno.

1-Heptansulfonato de sodio, R.A., Mallinckrodt.

Trietilamina, R.A., Merck Co.

D. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

- a) Bomba Waters Ass., modelo 590.
- b) Detector de longitud de onda variable, Waters Ass., modelo 481.
- c) Automuestreador WISP Waters Ass., modelo 710-B.
- d) Integrador Hewlett Packard, modelo 3396A.
- e) Columna Spherisorb ODS-2, 5 μ , 250 x 4.6 mm, Alltech.

E. Fase móvil.

Metanol : 1-heptansulfonato de sodio 0.005M (35:65)

- a) Solución 0.005M de 1-heptansulfonato de sodio:

Pesar 1.0113 g de 1-heptansulfonato de sodio y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver con aproximadamente 500 ml de agua grado cromatográfico, adicionar 10 ml de ácido acético glacial y llevar al aforo con agua grado cromatográfico.

- b) Mezclar 650 ml de la solución 0.005M de 1-heptansulfonato de sodio previamente filtrado por membrana de 0.45 μ con 350 ml de metanol grado cromatográfico previamente filtrado por membrana de 0.22 μ . Adicionar 0.2 ml de tricetilamina R.A. Mezclar y dejar que la solución recobre temperatura ambiente, ajustar el pH a 3.0 +/- 0.05 con ácido acético glacial. Desgasificar burbujeando helio durante 5 minutos.

F. Preparación de las soluciones estándar.

- a) Solución stock de estándar interno:

Pesar con exactitud aproximadamente 62.5 mg de metronidazol, estándar interno, y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml. Adicionar 20 ml de metanol grado cromatográfico y llevar al ultrasonido por 2 minutos. Diluir a volumen con metanol grado cromatográfico.

b) Soluciones estándar de calibración:

Pesar con exactitud y por separado aproximadamente 8.0, 10.0 y 12.0 mg de clorhidrato de fenilefrina, estándar de referencia y transferirlos respectivamente a matraces volumétricos de 100 ml. Adicionar a cada matraz 4 ml de la solución de estándar interno, 50 ml de fase móvil y llevar al ultrasonido durante 2 minutos. Diluir a volumen con fase móvil.

Estas soluciones corresponden al 80, 100 y 120% de clorhidrato de fenilefrina.

G. Preparación de la solución muestra.

a) Transferir el contenido de 2 frascos de producto a un matraz Erlenmeyer de 50 ml, agitar con ayuda de una barra magnética durante 10 minutos.

b) Tomar 2 ml de la solución y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. Adicionar 2 ml de la solución de estándar interno, 20 ml de fase móvil y llevar al ultrasonido durante 2 minutos. Diluir a volumen con fase móvil.

H. Condiciones cromatográficas.

inyectar las soluciones estándar de calibración y la solución muestra bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna: Spherisorb ODS 2, 5 μ , 250 x 4.6 mm.

Fase móvil: Metanol : heptansulfonato de sodio 0.005M, 35:65

Velocidad de flujo: 1.0 ml / min.

Longitud de onda: 280 nm.

Atenuación: 5

Volumen de inyección: 5 μ l

Velocidad de carta: 0.2 cm / min.

Temperatura: ambiente.

I. Cálculos.

a) Factor de respuesta (FR) para cada uno de los estándares de calibración

$$FR = \frac{A_i}{A_{std}} \times \frac{P_{std}}{100ml}$$

Donde:

A_i = Área del pico de estándar interno (metronidazol) en la solución estándar.

A_{std} = Área del pico de clorhidrato de fenilefrina en la solución estándar.

P_{std} = Peso del estándar de clorhidrato de fenilefrina en mg

b) Factor de respuesta promedio (FRP). Es el valor promedio de los tres factores de respuesta.

c) mg/ml de clorhidrato de fenilefrina en la muestra:

$$mg/ml = FRP \times \frac{A_m}{A_i} \times \frac{50 ml}{2 ml}$$

Donde:

A_m = Área de clorhidrato de fenilefrina en la muestra.

A_i = Área del estándar interno (metronidazol) en la muestra.

d) Porcentaje recuperado:

$$\% \text{ recuperado} = \frac{mg / ml \text{ encontrados}}{mg / ml \text{ etiquetados}} \times 100$$

2. Validación estadística del método.

A. Linealidad del sistema.

Para determinar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración utilizando 5 concentraciones (niveles) correspondientes al 70, 80, 100, 120 y 130% de la concentración central, por duplicado. Se determinó el coeficiente de correlación.

B. Linealidad del método.

La linealidad del método se evaluó a partir de 12 placebos adicionados a 6 diferentes concentraciones correspondientes al 70, 80, 90, 100, 110 y 120% de clorhidrato de fenilefrina. Se determinó el coeficiente de correlación, el error estándar de regresión, la pendiente, el intercepto y los límites de confianza al 95%.

C. Exactitud.

Para determinar la exactitud del método se utilizaron las mismas soluciones preparadas para la linealidad. Se determinó para los porcentajes de recobro la desviación estándar, la media y los intervalos de confianza al 95%.

D. Precisión.

1. *Repetibilidad:* Para evaluar la repetibilidad del sistema se analizaron 6 inyecciones del estándar al 100%. Se determinó el coeficiente de variación, la desviación estándar y sus límites de confianza al 95%.

Para evaluar la repetibilidad del método se analizaron 6 muestras de manera independiente. Se calculó el porcentaje de recobro promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

2. *Reproducibilidad:* Se evaluó por triplicado un lote de la formulación por dos analistas en dos días diferentes. Se analizaron un total de 12 datos. Se determinó para los porcentos de recobro la desviación estándar y el coeficiente de variación. Así mismo, los resultados fueron evaluados por medio de un análisis de varianza siguiendo un modelo de dos factores aleatorios.

E. Especificidad.

Para evaluar la especificidad del método analítico, muestras de materia prima, placebo de la formulación y formulación completa se sometieron a las siguientes condiciones de degradación acelerada:

Hidrólisis alcalina a 80°C con NaOH 0.1N.
Hidrólisis ácida a 80°C con HCl 1N.
Oxidación con peróxido de hidrógeno al 10%.
Temperatura de 80°C.
Luz de gabinete (2000 luxes).

Todas las muestras estuvieron sometidas a éstas condiciones durante aproximadamente 30 días.

Se prepararon muestras con los compuestos degradados y se inyectaron al cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones propuestas para el método: teniendo como variante que la determinación se realizó a tres longitudes de onda, 260, 280 y 300 nm.

F. Tolerancia.

1. *Prueba de reproducibilidad:* Se determinó inyectando en el sistema cromatográfico 2 soluciones estándar al 100%, 3 veces cada una, para un total de 6 inyecciones. Se calculó el coeficiente de variación.

2. *Parámetros cromatográficos:* Se utilizaron los cromatogramas de la prueba de reproducibilidad para calcular el factor de coileo, resolución, número de platos teóricos y factor de capacidad.

3. *Características cromatográficas:* Se evaluó con las siguientes variables: proporción de fase móvil, rango de pH y tres columnas cromatográficas. De los cromatogramas obtenidos se evaluaron los siguientes parámetros cromatográficos: platos teóricos / columna, factor de coileo, factor de capacidad y resolución.

G. Estabilidad de la muestra.

Se analizaron soluciones estándar y muestras almacenadas a dos diferentes condiciones (temperatura ambiente y refrigeración) y a tres diferentes tiempos (1, 3 y 5 días). Se determinó la desviación estándar relativa para cada temperatura.

H. Límite de detección y cuantificación.

Para evaluar el límite de detección y cuantificación primero se determinó el nivel de ruido inyectando al sistema cromatográfico fase móvil por triplicado. Un estimado del límite de detección se determinó como la respuesta igual a dos veces el nivel de ruido de las mediciones y, una respuesta igual a diez veces el nivel de ruido de las mediciones es un estimado del límite de cuantificación.

Utilizando el método propuesto, se determinó el límite de detección y cuantificación preparando e inyectando al sistema cromatográfico soluciones estándar a diferentes concentraciones correspondientes al 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10% de clorhidrato de fenilefrina.

En cada uno de los cromatogramas obtenidos se midió la respuesta en alturas de la señal de interés. Con los resultados obtenidos se graficó, por medio de mínimos cuadrados, la concentración en por ciento contra la respuesta en milivolts (mV), obtenida de la conversión de los milímetros medidos. Con un intervalo de confianza al 95% sobre la recta obtenida por mínimos cuadrados, se encontró el límite de detección y cuantificación, expresado en concentración.

V. RESULTADOS.

A. Linealidad del sistema.

Los resultados obtenidos de la curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema se muestran en la tabla II y figura 13:

TABLA II
LINEARIDAD DEL SISTEMA

Cantidad adicionada (mg)	Respuesta
7.07	9.0338
7.04	9.1474
7.99	11.6889
8.37	12.8104
10.10	18.8849
9.94	18.0776
12.06	26.6675
12.21	27.2180
13.02	30.9442
13.03	31.1416

Con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2):

$$r = 0,9968$$

$$r^2 = 0,9936$$

Ya que $r > 0.99$ y $r^2 > 0.98$, se considera que el sistema es lineal.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

FENILEFRINA - HCl.

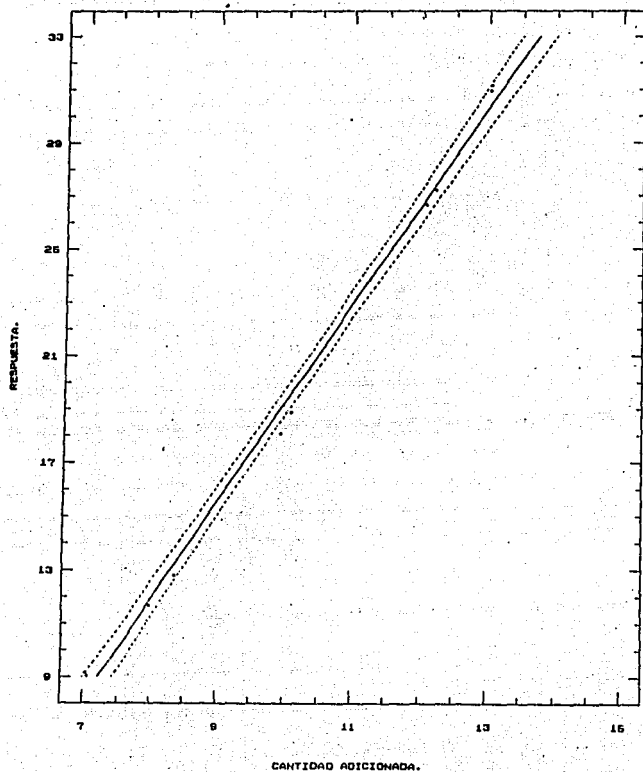


Figura No. 13 Linearidad del sistema. Cantidad adicionada vs respuesta medida.

B. Linealidad del método.

La tabla III y la figura 14 muestran los resultados obtenidos al evaluar la linealidad del método analítico después de analizar los 12 placebos adicionados a 6 diferentes concentraciones. Con los resultados obtenidos se determinó el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, la ordenada al origen y la pendiente. Las fórmulas empleadas para obtener los resultados se encuentran en el anexo A.

TABLA III
LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO

mg adicionados	mg recuperados	% adicionado	% recuperado
7.00	6.86	70.0	68.6
7.01	6.93	70.1	69.3
8.01	7.82	80.1	78.2
8.01	7.93	80.1	79.3
9.00	9.17	90.0	91.7
9.01	8.95	90.1	89.5
10.02	9.88	100.2	98.8
10.02	9.95	100.2	99.5
11.01	10.89	110.1	108.9
11.00	10.70	110.0	107.0
12.01	11.85	120.1	118.5
12.02	12.03	120.2	120.3

ordenada al origen	$a = -0.03996$
pendiente	$b = 0.9940$
coeficiente de correlación	$r = 0.9980$
coeficiente de determinación	$r^2 = 0.9959$
error estándar de regresión	$Sy/x = 0.1193$

Evaluación de la ordenada al origen:

- Prueba de hipótesis:	$H_0 \quad a = 0$
	$H_a \quad a \neq 0$

- Estadígrafo de contraste t de student:

Resultado $t_{cal} = -0.1260$
 $t_{tab} = 2.228$

Ya que t_{cal} entra en el intervalo de -2.228 a 2.228 (t_{tab}), puede considerarse estadísticamente que $a = 0$

- Cálculo de los intervalos de confianza al 95%:

LI = -0.4733
LS = 0.3934

Evaluación de la pendiente:

- Prueba de hipótesis: H_0 $b = 1$
 H_a $b \neq 1$

- Estadígrafo de contraste t de student:

Resultado: $t_{cal} = -0.2962$
 $t_{tab} = 2.228$

Ya que t_{cal} entra en el intervalo de -2.228 a 2.228 (t_{tab}), se puede considerar estadísticamente que $b = 1$

- Cálculo de los intervalos de confianza al 95%:

LI = 0.9492
LS = 1.0389

LINEALIDAD DEL METODO. FENILEFRINA - HCl

AREAS.

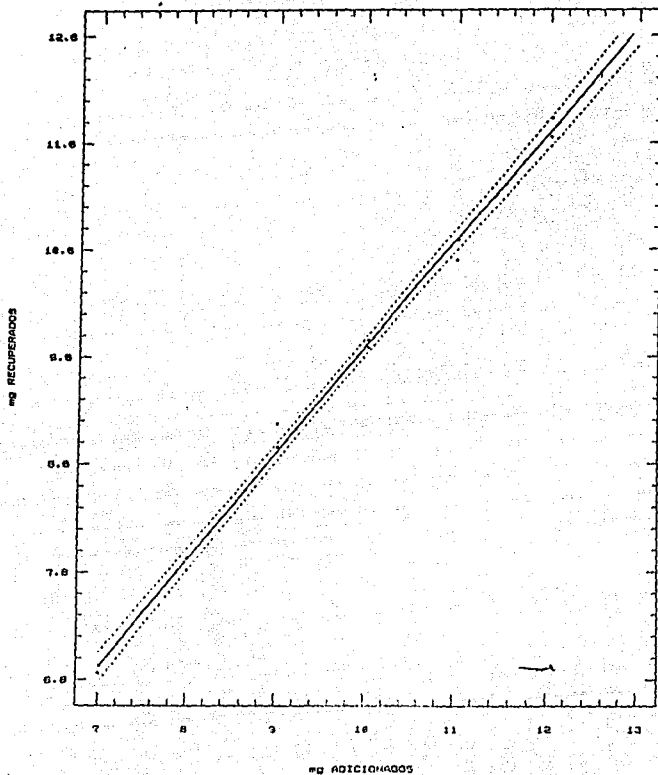


Figura No. 14 Linealidad del método, mg adicionados vs mg recuperados.

C. Exactitud.

A continuación se muestran los resultados para la exactitud del método obtenidos de las muestras evaluadas en la linealidad, expresadas en porcentos de recobro; tabla IV. Se calculó la media, desviación estándar y los intervalos de confianza al 95%. Las fórmulas utilizadas para obtener los resultados se muestran en el anexo B.

TABLA IV
EXACTITUD DEL METODO ANALITICO

mg adicionados	mg recuperados	% de recobro.
7.00	6.86	98.03
7.01	6.93	98.83
8.01	7.82	97.67
8.01	7.93	98.96
9.00	9.17	101.89
9.01	8.95	99.32
10.02	9.88	98.59
10.02	9.95	99.33
11.01	10.89	98.90
11.00	10.70	97.24
12.01	11.85	98.65
12.02	12.03	100.10

$$n = 12$$

$$\bar{x} = 98,96\%$$

$$DE = 1.20$$

$$C.V = 1.21\%$$

Como se puede observar, la media se encuentra entre 98.5 y 101.5% y el coeficiente de variación es menor a 1.5%; por lo que se considera que el método exacto.

- Cálculo de los intervalos de confianza al 95%:

$$LI = 98,1955$$

$$LS = 99,7229$$

D. Precisión:

Repetibilidad: En la tabla V se muestran los resultados de la repetibilidad del sistema, así como de la repetibilidad del método analítico. Para ambas pruebas se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación; además, la repetibilidad del método se evaluó a través de un estadígrafo de contraste χ_j^2 , con un nivel de significancia del 95%. Las fórmulas empleadas para obtener los resultados se muestran en el anexo C.

La repetibilidad del sistema fué evaluada utilizando una solución estándar equivalente al 100% y, para determinar la repetibilidad del método se empleó muestra de un lote de solución nasal que ha estado almacenado 12 meses a temperatura ambiente.

TABLA V
REPETIBILIDAD

No. inyección	Repetibilidad del sistema Respuesta mg / ml	Repetibilidad del método Porcentaje recuperado
1	0.05246	92.81
2	0.05318	94.76
3	0.05343	93.39
4	0.05304	93.92
5	0.05353	93.10
6	0.05384	92.98

- Cálculo de la media, desviación estándar y coeficiente de variación para la repetibilidad del sistema:

$$\bar{x} = 0.05325 \text{ mg / ml}$$

$$DE = 4.7634 \times 10^{-4}$$

$$C.V. = 0.89\%$$

- Cálculo de la media, desviación estándar y coeficiente de variación para la repetibilidad del método:

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 93.49\% \\ DE &= 0.7313 \\ C.V. &= 0.78\% \end{aligned}$$

- Estadígrafo de contraste χ^2 para la repetibilidad del método:

$$\begin{aligned} \text{- Prueba de hipótesis:} \quad H_0 & \quad \sigma \leq 1.5 \\ H_a & \quad \sigma > 1.5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{- Resultado:} \quad \chi^2_{\text{cal}} &= 1.1885 \\ \chi^2_{\text{tab}}(0.975, 5) &= 12.8 \end{aligned}$$

Como $\chi^2_{\text{cal}} < \chi^2_{\text{tab}}$, el método se considera preciso en cuanto a repetibilidad.

- Cálculo de los intervalos de confianza al 95%:

$$\begin{aligned} LI &= 0.4571 \\ LS &= 1.7939 \end{aligned}$$

3. *Reproducibilidad*: Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto analista-día se muestran en la tabla VI y VII. Se determinó para los porcentajes recuperados la desviación estándar, el coeficiente de variación y, se realizó un análisis de varianza. Las fórmulas empleadas para obtener los resultados se encuentran en el anexo D.

La reproducibilidad del método analítico fué evaluada utilizando un lote de la solución nasal que ha estado almacenado a temperatura ambiente por 12 meses.

**TABLA VI
REPRODUCIBILIDAD**

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	92.80	93.95
DIA 1	92.28	93.01
	92.87	93.61
	91.29	92.95
DIA 2	91.05	93.27
	91.00	90.99

$n = 12$
 $\bar{x} = 92.42\%$
 $DE = 1.0741$
 $C.V. = 1.16\%$

**TABLA VII
ANADEVA (Análisis de varianza)**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal.	F tab.
Analista	1	3.5100	3.5100	1.2943	38.51
Día	2	5.4236	2.7118	5.7753	6.06
Error	8	3.7564	0.46955	---	---

Ya que $F_a < F_{gla/gld}$; 0.05, el método analítico es reproducible por los analistas.

Ya que $F_d < F_{gld/gle}$; 0.05, el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

E. Especificidad.

En el caso de materia prima, no se observó la presencia de algún producto de degradación bajo ninguna de las diferentes condiciones de degradación.

Para la formulación completa, se lograron observar 3 productos de degradación bajo condiciones básicas y de temperatura (80°C), en el caso de hidrólisis ácida se observaron 4 productos de degradación, para oxidación 1 y en el caso de luz de gabinete se observaron 2 productos de degradación.

Con respecto al placebo de la formulación, bajo condiciones oxidativas y básicas se observó un producto de degradación, en el caso de hidrólisis ácida se observaron 3 y para temperatura (80°C) se observaron 2 productos de degradación.

El análisis a diferentes longitudes de onda y de pureza de pico permitió eliminar la posibilidad de coelución de algún producto de degradación al mismo tiempo que el clorhidrato de fenilefrina.

Las figuras 15-17 se muestra la no interferencia de los excipientes con los picos de interés. En la tabla VIII, IX y X se muestran los resultados generales obtenidos durante el estudio de la especificidad del método. Las figuras 17-26 muestran los cromatogramas más representativos.

TABLE VIII
ESPECIFICIDAD MATERIA PRIMA

Condición	No. de productos de degradación	Resolución *
No se observaron productos de degradación		

* Con respecto al pico de interés, clorhidrato de fenilefrina ó metronidazol (estándar interno).

TABLA IX
ESPECIFICIDAD PLACEBO DE LA FORMULACION

Condición	No. de productos de degradación	Resolución *
80°C	2	2.06
Hidrólisis ácida	3	1.92
Hidrólisis básica	1	1.95
Oxidación	1	---
Luz de gabinete.	---	---

* Con respecto al pico de interés, clorhidrato de fenilefrina ó metronidazol (estándar interno).

TABLA X
ESPECIFICIDAD FORMULACION COMPLETA

Condición	No. de productos de degradación	Resolución *
80°C	3	2.8, 2.6
Hidrólisis ácida	4	2.3, 2.2
Hidrólisis básica	3	2.21, 1.79
Oxidación	1	---
Luz de gabinete	2	---

* Con respecto al pico de interés, clorhidrato de fenilefrina ó metronidazol (estándar interno).

F. Tolerancia.

1. *Prueba de reproducibilidad:* La tabla XI muestra los resultados obtenidos de las inyecciones de las soluciones estándar al 100% para la evaluación de la reproducibilidad. Con los datos obtenidos se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

TABLA XI
TOLERANCIA / REPRODUCIBILIDAD

Respuesta mg / ml
0.05305
0.05313
0.05269
0.05249
0.05265
0.05302

n = 6

$\bar{x} = 0.05284 \text{ mg / ml}$

DE = 2.6028×10^{-4}

C.V. = 0.50%

2. *Parámetros cromatográficos:* Con los cromatogramas obtenidos de la prueba de reproducibilidad se calcularon los diferentes parámetros cromatográficos como número de platos teóricos, factor de coleo, resolución, factor de capacidad, etc. La tabla XII muestra los resultados obtenidos.

TABLA XII
TOLERANCIA / PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	4982.7	5320.6
Eficiencia	19930.8	21282.5
Factor de coleo	1.04	1.06
Factor de capacidad	0.21	0.74
Selectividad (α)	3.55	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	6.45	1.81

3. *Características cromatográficas:* Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

Cambio en la proporción de fase móvil metanol: heptansulfonato de sodio 0.005M 30:70 y 40:60. Las tablas XIII y XIV muestran los resultados.

Cambió en el pH de la fase móvil, a pH de 2.5 y 3.5. En la tabla XV y XVI se pueden observar los resultados obtenidos.

Cambió en la columna (fase estacionaria) por: Spherisorb ODS-1, 5 μ ; Adsorbosphere C 18, 5 μ y μ -Bondapack C 18, 10 μ . Las tablas XVII, XVIII y XIX muestran los resultados obtenidos.

TABLA XIII

Proporción de fase móvil 30:70 (metanol:heptansulfonato de sodio 0.005M)

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	6142.6	7063.0
Eficiencia	24570.3	28251.9
Factor de coleo	1.2	1.17
Factos de capacidad	0.88	2.1
Selectividad (α)	2.40	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	9.97	1.12

TABLA XIV

Proporción de fase móvil 40:60 (metanol:heptansulfonato de sodio 0.005M)

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	3619.7	4005.6
Eficiencia	14478.9	16022.6
Factor de coleo	1.11	1.16
Factos de capacidad	0.47	1.04
Selectividad (α)	2.24	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	5.09	1.25

TABLA XV
pH 2.5

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	4384.6	3568.9
Eficiencia	17538.3	14275.5
Factor de coeio	1.13	1.09
Factos de capacidad	0.36	0.54
Selectividad (α)	1.47	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	1.85	2.57

TABLA XVI
pH 3.5

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	4579.8	5201.1
Eficiencia	18319.3	20804.6
Factor de coeio	1.03	1.04
Factos de capacidad	0.46	1.23
Selectividad (α)	2.69	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	7.30	2.01

TABLA XVII
Columna Spherisorb ODS-1, 5 μ .

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	3271.6	3702.2
Eficiencia	13086.4	14808.8
Factor de coeio	1.02	1.05
Factos de capacidad	0.84	1.27
Selectividad (α)	1.50	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	3.05	---

TABLA XVIII
Columna Adsorbosphere C18, 5 μ .

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	3885.4	7815.2
Eficiencia	15541.8	31260.6
Factor de coleo	1.10	1.23
Factos de capacidad	0.60	1.94
Selectividad (α)	3.21	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	11.3	---

TABLA XIX
Columna μ -Bondapack C18, 10 μ .

Parámetros cromatográficos	Metronidazol	Clorhidrato de fenilefrina
Platos teóricos/columna	3403.8	3867.2
Eficiencia	11346.1	12890.8
Factor de coleo	1.04	1.04
Factos de capacidad	0.37	0.71
Selectividad (α)	1.91	
Resolución	entre metronidazol y fenilefrina-HCl	entre fenilefrina-HCl y la señal más próxima
	3.34	2.02

G. Estabilidad de las soluciones estándar y de las soluciones muestra.

Los resultados obtenidos de la estabilidad de las soluciones estándar, a temperatura ambiente y 5°C se muestran en las tablas XX y XXI, respectivamente. Las tabla XXII muestra los resultados de la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente y la tabla XXIII muestra los resultados de la estabilidad de la muestra a 5°C.

TABLA XX
Soluciones estándar a temperatura ambiente; mg / ml.

Inicial	Primer día	Tercer día	Quinto día
0.05324	0.05179	0.05145	0.05153
0.05230	0.05166	0.05212	0.05153
0.05334	0.05276	0.05252	0.05274
$\bar{x} = 0.05296$	$\bar{x} = 0.05207$	$\bar{x} = 0.05203$	$\bar{x} = 0.05193$
C.V. = 1.08%	C.V. = 1.16%	C.V. = 1.04%	C.V. = 1.35%

n = 12
 $\bar{x} = 0.05225$ mg/ml
 C.V. = 1.29%

TABLA XXI
Soluciones estándar a 5°C; mg / ml.

Inicial	Primer día	Tercer día	Quinto día
0.05324	0.05401	0.05324	0.05232
0.05230	0.05315	0.05258	0.05143
0.05134	0.05408	0.05305	0.05211
$\bar{x} = 0.05296$	$\bar{x} = 0.05374$	$\bar{x} = 0.05295$	$\bar{x} = 0.05195$
C.V. = 1.08%	C.V. = 0.96%	C.V. = 0.64	C.V. = 0.89

n = 12
 $\bar{x} = 0.05290$ mg/ml
 C.V. = 1.48%

TABLA XXII
Soluciones muestra a temperatura ambiente; en %.

Inicial	Primer día	Tercer día	Quinto día
91.7815	91.4239	92.4291	92.5049
92.6171	91.5725	91.3262	92.2464
92.9978	91.8211	91.3577	92.5248
$\bar{x} = 92.4655$	$\bar{x} = 91.6058$	$\bar{x} = 91.7043$	$\bar{x} = 92.4254$
C.V. = 0.67%	C.V. = 0.22%	C.V. = 0.68%	C.V. = 0.17%

$n = 12$
 $\bar{x} = 92.0503\%$
 $C.V. = 0.62\%$

TABLA XXIII
Soluciones muestra a 5°C; en %.

Inicial	Primer día	Tercer día	Quinto día
91.7815	92.3255	92.5060	92.5049
92.6171	92.7400	93.9309	92.2464
92.9978	92.5556	91.5198	92.5248
$\bar{x} = 92.4655$	$\bar{x} = 92.5403$	$\bar{x} = 92.6523$	$\bar{x} = 92.4254$
$C.V. = 0.67\%$	$C.V. = 0.22\%$	$C.V. = 1.31\%$	$C.V. = 0.17\%$

$n = 12$
 $\bar{x} = 92.5209\%$
 $C.V. = 0.65\%$

H. Límite de detección y cuantificación.

La tabla XXIV muestra los mV obtenidos de las soluciones estándar preparadas a diferentes concentraciones y de las cuales se midió (en mm) la respuesta en alturas de la señal de interés. Se calculó el coeficiente de correlación de la regresión.

La figura 27 muestra gráficamente los resultados obtenidos para la evaluación del límite de detección y cuantificación.

TABLA XXIV
LIMITE DE DETECCION (LLD) Y CUANTIFICACION (LLC)

Concentración (%)	Respuesta (mV)
0.000	0.0000
1.013	0.3200
1.013	0.2752
2.026	0.4843
2.026	0.5269
4.052	0.9451
4.052	0.9280
6.504	1.4293
6.504	1.4549
8.104	1.8368
8.104	1.8581
10.130	2.2464
10.130	2.2208

Coefficiente de correlación = 0.9992

Límite de detección (LLD) = 0.48%

Límite de cuantificación (LLQ) = 2.42%

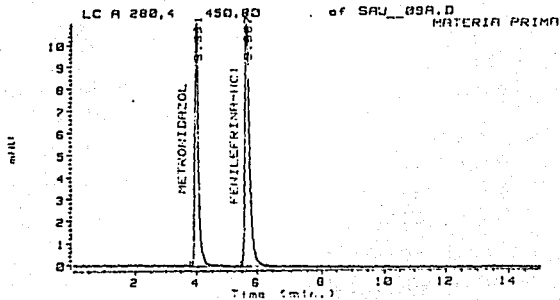


Figura No. 15 Materia Prima.

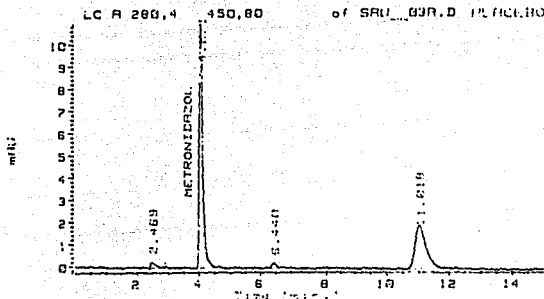


Figura No. 16 Placero de la formulación.

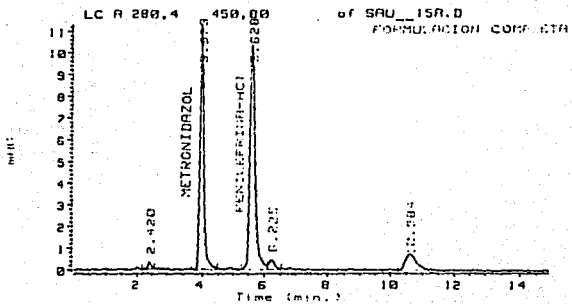


Figura No. 17 Formulación completa.

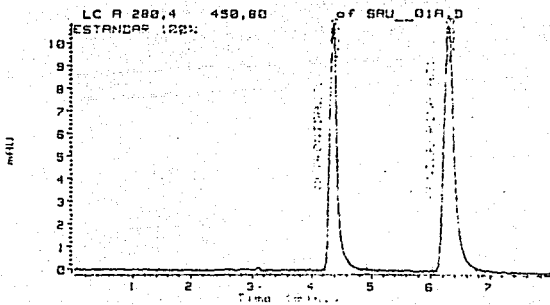


Figura No. 18 Estándar de clorhidrato de fenilefrina al 100%

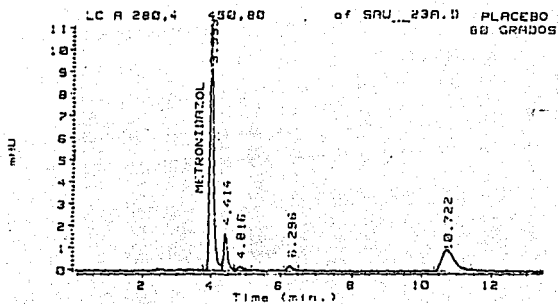


Figura No. 19 Placebo de la formulación, 80°C.

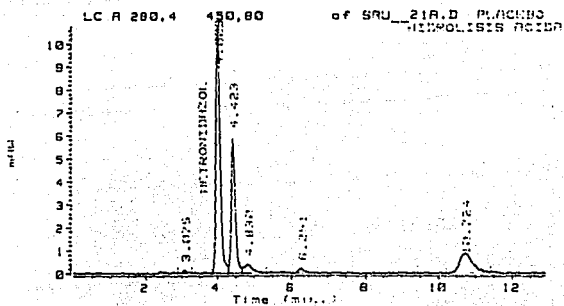


Figura No. 20 Placebo de la formulación, hidrólisis ácida.

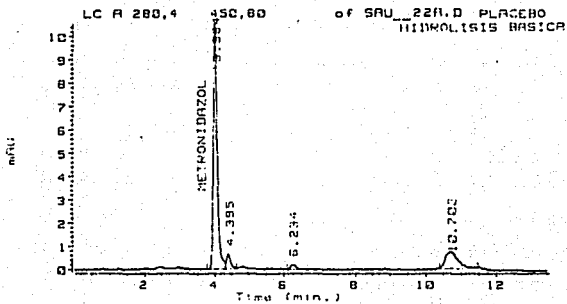


Figura No. 21 Placebo de la formulación, hidrólisis básica.

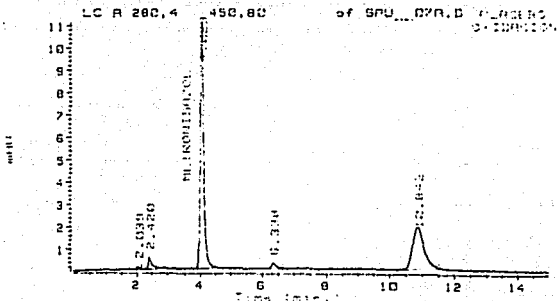


Figura No. 22 Placebo de la formulación, oxidación.

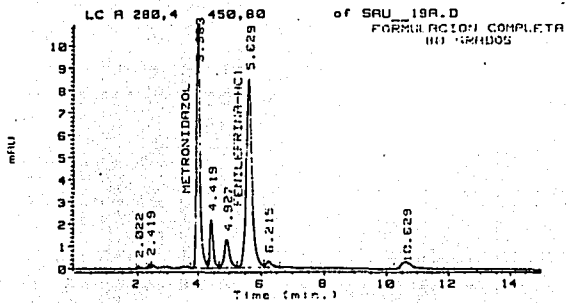


Figura No. 23 Formulación completa, 80°C.

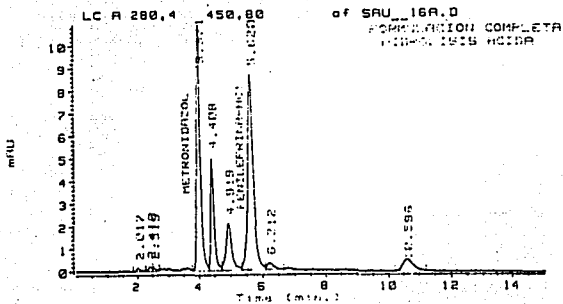


Figura No. 24 Formulación completa, hidrólisis ácida.

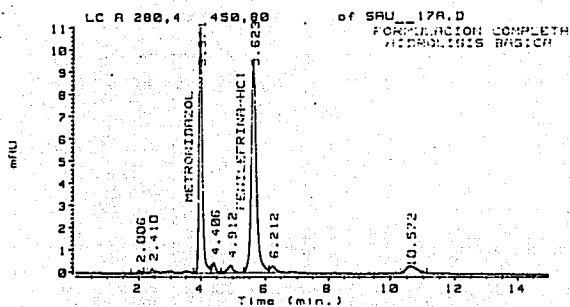


Figura No. 25 Formulación completa, hidrólisis básica.

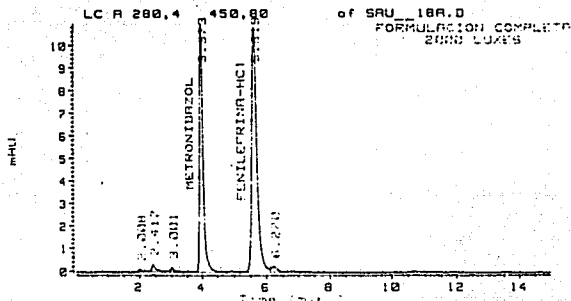
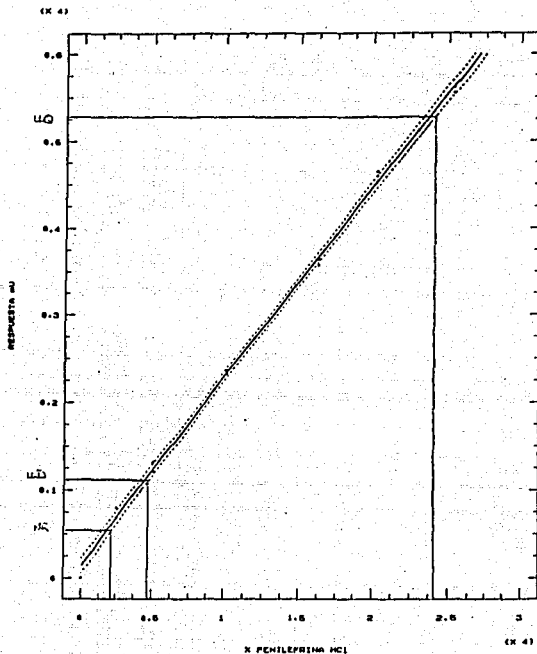


Figura No. 26 Formulación completa, luz de gabinete.

LLD Y LLQ. PENILEPRINA HCl.



Coefficiente de correlación = 0.9992
 Límite de detección (L.D) = 0.43%
 Límite de cuantificación (LLQ) = 2.42%

Figura No. 27 Límite de detección y cuantificación.

VI. ANALISIS DE RESULTADOS.

Los requerimientos mínimos con los que debe cumplir un método para considerarse validado son: ser lineal, preciso, exacto y reproducible. Para métodos que van a ser utilizados en estudios de estabilidad, además de lo anterior, debe ser específico.

Un método analítico se considera lineal si su representación gráfica se aproxima a una línea recta, su coeficiente de correlación tiende a uno, su ordenada al origen es igual a cero y su pendiente es igual a uno. Observando los resultados obtenidos para la evaluación de la linealidad, del sistema y del método, vemos que estadísticamente los criterios antes mencionados se cumplen, por lo tanto, el método analítico resultó ser lineal.

En cuanto a la exactitud del método, la media de los porcentajes recuperados cae dentro de los límites de 98.5-101.5%, y su coeficiente de variación es menor a 1.5%; por lo que consideramos el método exacto.

Para métodos cromatográficos, se considera preciso cuando su coeficiente de variación es menor a 1.5%. En los tres casos (repetibilidad del sistema, del método y reproducibilidad) se cumple este criterio. Además, los resultados de la reproducibilidad fueron evaluados por medio de un análisis de varianza siguiendo un modelo de dos factores aleatorios, el cual demostró que el método es reproducible por dos analistas en dos días diferentes. Por todo esto, podemos decir que el método es preciso.

Al evaluar la especificidad del método analítico frente al placebo de la formulación se encontró, que a las condiciones de degradación propuestas hay un total de 7 productos de degradación; de ellos, ninguno muestra interferencia analítica con los picos de interés. En todos los casos, la resolución entre los productos de degradación y las señales de interés fué mayor a 1.5. De los resultados mostrados en la tabla IX, se advierte que las condiciones a las cuales es más susceptible el placebo de la formulación es temperatura e hidrólisis ácida.

Al evaluar la especificidad utilizando materia prima y las mismas condiciones de degradación, se encontró que hasta el tiempo analizado (30

días) no apareció ningún producto de degradación; sin embargo, en la formulación completa, en cada una de las condiciones de degradación apareció un número mayor de productos de degradación con respecto al placebo; esto puede deberse a que el clorhidrato de fenilefrina como materia prima sólida muestra una gran estabilidad en las condiciones ensayadas, sin embargo, al encontrarse en solución e interactuar con los demás excipientes de la formulación sea más susceptible a la degradación. A pesar de esto, los 13 productos de degradación encontrados no muestran interferencia analítica con las señales de interés. En todos los casos, la resolución entre los productos de degradación y las señales de interés fué mayor a 1.5.

Después de analizar las muestras a 280 nm, que es la longitud de onda propuesta en el método analítico, las muestras utilizadas para determinar la especificidad del método analítico fueron ensayadas en un detector de arreglo de diodos que ayudó a confirmar la pureza de cada una de las señales cromatográficas a diferentes longitudes de onda, lo que permitió comprobar que sobre las señales de interés no coeluyeron productos de degradación.

Con los resultados obtenidos a 280 nm y de pureza de las señales cromatográficas a diferentes longitudes de onda, se concluye que el método analítico es específico frente a excipientes de la formulación y productos de degradación.

La tolerancia nos da una medida de la habilidad del método para permanecer sin alteraciones frente a variaciones en los parámetros. Se encontró que no es recomendable cambiar la proporción de fase móvil ya que esto disminuye la resolución entre clorhidrato de fenilefrina y la señal más próxima, originando resultados poco confiables. En cuanto al pH, se puede variar 0.5 unidades hacia arriba ya que mejora la resolución entre el metronidazol y el clorhidrato de fenilefrina y, de éste con la señal más cercana. Una modificación de 0.5 unidades de pH hacia abajo no trae consecuencias significativas, la eficiencia y la resolución no se ven alteradas significativamente, es decir, pequeñas variaciones de pH no traen problemas en la cuantificación. En cuanto a la modificación de la fase estacionaria tenemos que se puede llegar a utilizar, en el caso de no tener la que indica el método, una columna μ -Bondapak C18, 10 μ . Esta columna no tiene la misma eficiencia que la Spherisorb ODS 2 de 5 μ , pero mantiene una buena resolución entre el clorhidrato de fenilefrina y la señal más próxima; aunque disminuye con respecto al metronidazol, pero sigue siendo bastante aceptable.

Los coeficientes de variación obtenidos para la determinación de la estabilidad de las soluciones estándar y soluciones muestra son menores a 1.5% durante los 5 días que se realizó la prueba; lo que nos indica que de ser necesario guardar las muestras y estándares para luego inyectarlos, éstos son estables hasta 5 días después de preparados, ya sea que se almacenen a temperatura ambiente o en refrigeración; sin embargo, se sugiere que no pasen más de 48 hrs. antes de inyectarlas.

En cuanto al límite de detección y cuantificación, éstos no son requisitos de validación ya que el tipo de método que se validó se encuentra dentro de la categoría I y no requiere de éstos ensayos, sin embargo, se realizaron estas determinaciones previendo que en un futuro se requiera contar con un método para cuantificar trazas, para limpieza de un equipo, etc. Se encontró que el método analítico logra cuantificar clorhidrato de fenilefrina a una concentración de aproximadamente de 2.5×10^{-3} mg/ml (2.5%).

Otras características adicionales que pueden atribuirse al método son: rápido, en cuanto a preparación de muestras y tiempo total de corrida y; económico, no requiere de alguna técnica especial de extracción y sólo utiliza reactivos de uso común en el laboratorio.

VII. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos, quedó establecido que el método analítico cumple con los requisitos y parámetros establecidos para la identificación y cuantificación de clorhidrato de fenilefrina en una solución nasal.

El método analítico además de ser lineal, exacto, preciso y reproducible, es estabilidad específico; ya que demostró que logra separar los productos de degradación de los picos de interés, por lo que además de aplicarse en análisis de rutina se puede aplicar a productos en estabilidad.

Por todo lo anterior se concluye que el objetivo propuesto en un inicio se cumplió, ya que se realizó la validación de un método analítico el cual es capaz de llevar a cabo la identificación y cuantificación de clorhidrato de fenilefrina en una solución nasal y, además, es aplicable a estudios de estabilidad.

Otras características del método analítico son: económico, ya que no requiere de ninguna técnica especial de extracción y sólo emplea reactivos de uso común en el laboratorio; rápido, ya que el tiempo total de análisis es corto, tanto en la preparación de estándares y muestras como en el tiempo de corrida, lo cual es especialmente importante si se trata de un laboratorio de control de calidad donde el tiempo es uno de los factores principales; y versátil, ya que puede ser empleado para la materia prima, solución a granel, producto terminado y producto terminado en estabilidad.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Mc Nair, H. A. y Esquivel, B. H., *Cromatografía líquida de alta presión*, 2da. edición, Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, O.E.A., 1980. pp 2-38, 57-63.
2. Snyder, L. R., & Kirkland, J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd, edition, John Wiley & Sons Inc., New York, 1979. pp 2-5, 16-30, 84-140.
3. Snyder, L. R., Glajch, J. L. & Kirkland, J.J., *Practical HPLC Method Development*, 1st. edition, John Wiley & Sons Inc., New York, 1988. pp 107-114, 137-142, 248-251.
4. Dolan, J. W., & Snyder, L. R., *Troubleshooting LC Systems*, 1st. edition, The Humana Press, New Jersey, 1989. pp 385-454.
5. Schirmer, R. E., *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 2nd. edition, The CRC Press. pp 242-259, 262-264.
6. Ravindranath, B., *Principles and Practice of Chromatography*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1989. pp 256-261.
7. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. Secretaría de Salud, *Métodos Analíticos, Validación*. 1990.
8. Hamilton, R. J. & Sewell, P. A., *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1978. pp 12-36.
9. *Memorias del curso de Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución impartido por Perkin Elmer, México, D. F., Junio 1989.*
10. Tsuji, K., Morozowich, W., *CLG and HPLC Determination of Therapeutic Agents*, Marcel Dekker Inc., New York, 1978. pp 2-133, 1221-1233.
11. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC.*, Centro Educativo Analítico, Hewlett-Packard, México D. F., 1988.

12. García de Marina, A. y Del Castillo, B., *Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución*, 1era. edición, Ed. Limusa, México D. F., 1988. pp 15-21, 38-50, 83-97, 104-116, 153-157.

13. Florey, K. A., *Analytical Profiles of Drugs Substances*, Vol. , Academic Press, Inc., U.S.A. 1986. pp 483-512.

14. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 5a. edición, Secretaría de Salud, 1988. pp 672-673, 1213-1214.

15. *The United States Pharmacopeia*, XXII edition, and *National Formulary XVII* edition, 1990. pp 1069-1071.

16. *British Pharmacopoeia*, 1993. pp 509.

17. *European Pharmacopoeia*, 2nd. edition, 1991. pp 632.

18. *The Pharmacopoeia of Japan*, 11th. edition, 1986. pp 826-828.

19. Windholz, M. et al., *The Merck Index*, 10th. edition, Merck Co., 1989. pp 1157-1158.

20. Martindale., *The Extra Pharmacopoeia*, 30th. edition, The Pharmaceutical Press, 1993. pp 1236-1238, 1251-1252.

21. *The United States Pharmacopoeia*, XXIII edition, and *National Formulary XVIII* edition, 1995. pp 1211-1213, 1768-1769, 1774-1777, 1982-1984.

22. Litter, M., *Farmacología Experimental y Clínica*, 7ma. edición, Ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1988. pp 472-473, 493-495.

23. Hokanson, G. C., *A Life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Product Development*, Part I, *The Initial Method Validation Process & Part II, Changes and the Need for Additional Validation*. *Pharmaceutical Technology*, September-October 1994.

24. *Manual de referencia Hewlett Packard para el Detector de arreglo de Diodos*, 1984.

25. Tsokos, M., Estadística para Biología y Ciencias de la Salud, 1era. edición, Ed. Interamericana-McGraw-Hill, España, 1987. pp 159-224, 481-485.

26. Rodríguez Caranza, R., Vademécum Académico de Medicamentos, Tomo I, 1era. edición, Facultad de Medicina de la U.N.A.M, Dirección General de Publicaciones, México, D.F., 1984. pp 342-343.

27. Schrifman, H., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. 48, (1959). pp 111-113.

28. Fagard, J., J. Pharm. Belg., 16 (3-4), (1961). pp 128-133. CA 61:6870e.

ANEXO A

FORMULAS PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DEL METODO.

I. Inferencias respecto a la ordenada al origen:

- Hipótesis: Ho a = A
 Ha a = A

donde A = 0

- Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ cal} = \frac{a - A}{S_{y/x} \{ \Sigma x^2 / n - \Sigma (x_j - \bar{x})^2 \}^{1/2}}$$

$$S_{y/x} = \{ (\Sigma y^2 - a \Sigma y - b \Sigma xy) / n - 2 \}^{1/2}$$

- Criterios:

Si

$$t \text{ cal} < t (0.975, n-2 \text{ gl})$$
$$t \text{ cal} > t (0.025, n-2 \text{ gl})$$

puede considerarse que estadísticamente a = 0

- Intervalo de confianza al 95%:

$$a \pm t_{\alpha/2} S_{y/x} \{ \Sigma x^2 / n - \Sigma (x_j - \bar{x})^2 \}^{1/2}$$

2. Inferencias respecto a la pendiente:

- Hipótesis: $H_0 \quad b = B$
 $H_a \quad b \neq B$

donde $B = 1$

- Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{cal}} = \frac{(b - B) (S_{y/x}) (n-1)^{1/2}}{S_{y/x}}$$

- Criterios:

Si

$$t_{\text{cal}} < t(0.975, n-2 \text{ gl})$$

$$t_{\text{cal}} > t(0.025, n-2 \text{ gl})$$

puede considerarse que estadísticamente $b = 1$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$b \pm t_{\alpha/2} \frac{S_{y/x}}{S_x (n-1)^{1/2}}$$

Si ambas hipótesis, para la ordenada al origen y para la pendiente, son aceptadas, el método es lineal.

ANEXO B

FORMULAS PARA EVALUAR LA EXACTITUD.

- Intervalo de confianza al 95%:

$$\bar{x} \pm t_{\alpha/2} (S / (n)^{1/2})$$

ANEXO C

FORMULAS PARA EVALUAR LA PRECISION / REPETIBILIDAD.

- Hipótesis: Ho $\sigma < 1.5\%$
 Ha $\sigma > 1.5\%$

- Estadígrafo de contraste:

$$x_i^2 \text{ cal} = \frac{(n-1) (S)^2}{\sigma^2}$$

- Criterios:

Si

$$x_i^2 \text{ cal} < x_i^2 (0.975, n-1 \text{ gl})$$

puede considerarse preciso / repetible.

- Intervalo de confianza:

$$\frac{(n-1) (S)^2}{x_i^2 (0.975, n-1 \text{ gl})} < \sigma < \frac{(n-1) (S)^2}{x_i^2 (0.025, n-1 \text{ gl})}$$

- Coeficiente de variación:

$$\begin{aligned} \text{C.V.} &= (S / \bar{x}) 100 \\ \text{C.V.} &< 1.5\% \end{aligned}$$

ANEXO D

FORMULAS PARA EVALUAR LA REPRODUCIBILIDAD.

El modelo hipotético que representa este caso es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_j(i) + \epsilon_k(ij)$$

donde:

Y_{ijk} = ensayo de la sustancia de interés de la k ésima muestra analizada por el i ésimo analista en el j ésimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

α_i = efecto del analista en el ensayo.

$\delta_j(i)$ = efecto del día anidado en el analista.

$\epsilon_k(ij)$ = error del método analítico.

a = número de analistas (donde $a = 2$).

b = número de días (donde $d = 2$).

r = número de replicaciones (donde $r = 3$).

- Efecto por el analista:

Si

$$F_{cal} a < F_{tab} (0.95)_{gla/gld}$$

el método analítico es reproducible por los analistas.

- Efecto por el día:

Si

$$F_{\text{cal d}} < F_{\text{tab}}(0.95)_{\text{gld/glc}}$$

el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F tab
Analista	$gla = a - 1$	SCa	$MCa = SCa/gla$	$Fa = MCa/MCd$	$F_{gla/gld}$
Día	$gld = (d - 1)a$	SCd	$MCD = SCd/gld$	$Fd = MCD/MCe$	$F_{gld/glc}$
Error	$glc = (r - 1)ad$	SCe	$MCE = SCe/glc$	-----	-----

$$SCa = (\sum Y_i^2 / d r) - (Y^2 / a d r)$$

$$SCd = (\sum \sum Y_{ij}^2 / r) - (\sum Y_i^2 / d r)$$

$$SCe = (\sum \sum \sum Y_{ijk}^2) - (\sum \sum Y_{ij}^2 / r)$$