



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"OBTENCION DE UN METODO
SELECTIVO PARA LA CUANTIFICACION
SIMULTANEA DE CITRATO DE
OXELADINA Y CLORHIDRATO DE
BROMHEXINA POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION,
EN JARABE"

UNAM
FES
ZARAGOZA



Lo humano eje
de nuestra reflexión

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

RICARDO BARRADAS HUESCA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL CENTRO A.F. DE ESTUDIOS
TECNOLOGICOS (CAFET S.A.) POR LO QUE AGRADEZCO AL
M. en C. SALVADOR SALADO CARBAJAL SU VALIOSA COLABO-
RACION.**

A DIOS

**A MIS PADRES:
IGNACIA HUESCA L. Y LEONARDO BARRADAS S.
POR TODO LO QUE ME HAN DADO.**

**A LIDIA ALVAREZ POR SU INCONDICIONABLE APOYO
Y COMPRESION EN LOS MOMENTOS DIFICILES.**

GRACIAS.

JURADO

PRESIDENTE: Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ
VOCAL: M. en C. SALVADOR SALADO CARBAJAL
SECRETARIO: Q.F.B. IRMA ALEJANDRE RAZO
SUPLENTE: M. en C. LOUERDES A. CASTILLO GRANADA
SUPLENTE: Q.F.B. LETICIA CRUZ ANTONIO

INDICE

	PAGINA
1.INTRODUCCION	1
2.GENERALIDADES	2
2.1.Antitusivos o Antitusigenos	2
2.2.Espectorantes y Mucoliticos	3
2.3.Citrato de Oxeladina	4
2.3.1.Monografia	4
2.3.2.Farmacodinamia y farmacocinética	8
2.3.3.Toxicidad	8
2.3.4.Usos Terapéuticos	9
2.4.Clorhidrato de Bromhexina	10
2.4.1.Monografia	10
2.4.2.Farmacodinamia y Farmacocinética	14
2.4.3.Toxicidad	15
2.4.4.Usos Terapéuticos	15
2.5.Cromatografía de líquidos.....	16
2.5.1.Cromatografía de Par-Iónico en FaseReversa.....	18
2.5.2.Conceptos Basicos de Cromatografía de Líquidos.....	21
2.5.3.Instrumentos para Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	25
2.6.Validación de Métodos Analíticos.....	26
2.6.1.Linealidad.....	26
2.6.2.Exactitud.....	27
2.6.3.Precisión.....	27
2.6.4.Especificidad.....	28
2.6.5.Tolerancia.....	28
2.6.6.Estabilidad de la Muestra.....	29
2.6.7.Limite de cuantificación.....	29
2.6.8.Limite de detección.....	29
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
4.OBJETIVOS.....	31
5.HIPOTESIS.....	32
6.DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	33
6.1.Equipo e Instrumentos.....	33
6.2.Material.....	34
6.3.Reactivos.....	34
6.4.Método.....	35
6.4.1.Caracterización de las Materias Primas.....	35
6.4.2.Desarrollo del Método.....	35

6.5. Validación del Método.....	48
6.5.1. Linealidad.....	48
6.5.2. Exactitud.....	48
6.5.3. Precisión.....	48
6.5.4. Especificidad.....	49
6.5.5. Estabilidad.....	50
6.5.6. Tolerancia.....	50
7. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	51
7.1. Citrato de Oxeladina.....	51
7.1.1. Evaluación de la Linealidad del Método.....	51
7.1.1.1. Coeficiente de Correlación y de Determinación.....	52
7.1.1.2. Evaluación de la Ordenada al Origen.....	52
7.1.1.3. Evaluación de la Pendiente.....	53
7.1.2. Exactitud del Método.....	55
7.1.2.1. Exactitud del Método en el Intervalo Estudiado.....	55
7.1.2.2. Exactitud al 100 %.....	56
7.1.3. Precisión de Método.....	57
7.1.3.1. Repetibilidad.....	57
7.1.3.2. Reproducibilidad.....	57
7.1.4. Especificidad del Método.....	58
7.1.5. Estabilidad de la Muestra.....	62
7.1.6. Tolerancia del Sistema.....	63
7.2. Clorhidrato de Bromhexina.....	64
7.2.1. Evaluación de la Linealidad del Método.....	64
7.2.1.1. Coeficiente de Correlación y de Determinación.....	65
7.2.1.2. Evaluación de la Ordenada al Origen.....	65
7.2.1.3. Evaluación de la Pendiente.....	66
7.2.2. Exactitud del Método.....	68
7.2.2.1. Exactitud del Método en el Intervalo Estudiado.....	68
7.2.2.2. Exactitud al 100 %.....	69
7.2.3. Precisión de Método.....	70
7.2.3.1. Repetibilidad.....	70
7.2.3.2. Reproducibilidad.....	70
7.2.4. Especificidad del Método.....	71
7.2.5. Estabilidad de la Muestra.....	75
7.2.6. Tolerancia del Sistema.....	76
8. CONCLUSIONES.....	77
9. ANEXOS.....	79
10. BIBLIOGRAFIA.....	83

I. INTRODUCCION

Los jarabes antitusivos son formulaciones complejas que contienen varios ingredientes activos y una amplia gama de excipientes como colorantes, saborizantes, edulcorantes y conservadores. Muchos de éstos productos están diseñados como preparaciones para varios usos terapéuticos, conteniendo una variedad de compuestos amino que actúan como antihistaminicos, descongestionantes o antitusivos.(1).

La cuantificación de los principios activos en esta forma farmacéutica es un paso importante en el control de proceso, producto terminado y estudios de estabilidad, para esto se requiere de un método que los cuantifique de manera selectiva, precisa y exacta.

Este trabajo consistió en desarrollar un método analítico para cuantificar simultáneamente citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina en jarabe, utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), ya que esta técnica ofrece versatilidad, precisión y sensibilidad; logrando con esto que el análisis sea práctico y confiable.

La validación del método analítico se realizó siguiendo los parámetros requeridos en la USP 23 para métodos de categoría I, que son métodos analíticos para cuantificar el mayor componente en materias primas o producto a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados. Estos parámetros son: exactitud, precisión, linealidad en el intervalo de trabajo, especificidad, estabilidad de la muestra y tolerancia.

De los resultados obtenidos se concluye que el método cumple satisfactoriamente todos los parámetros estudiados y que es útil para la cuantificación de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina, en jarabe por lo tanto puede emplearse como método de rutina para control de calidad y como indicador de estabilidad.

2. GENERALIDADES

2.1. ANTITUSIVOS O ANTITUSIGENOS (2).

Son sustancias que inhiben o suprimen específicamente la tos. Esta inhibición puede ser inducida de diferentes maneras:

- a) Depresión del centro bulbar o de los centros superiores.
- b) Aumento del umbral de las zonas reflexógenas periféricas.

Los antitusígenos pueden ser clasificados de diferentes maneras:

a) Los de acción central: los cuales deprimen el sistema nervioso central e inhiben el centro "tusígeno" en el bulbo, o elevan el umbral de los estímulos centrales nocivos y disminuyen el reflejo tusígeno.

b) Los de acción periférica: los cuales actúan principalmente sobre los receptores del tracto respiratorio.

Por otra parte estas sustancias pueden ser clasificadas como antitusígenos narcóticos como los alcaloides del opio, los fenotrópicos naturales y semisintéticos como la codeína, etilmorfina ó antitusígenos no narcóticos como los fenilbutanoles, derivados del ácido dietilfenilacético, difenilpropanoles etc.

El citrato de oxeladina pertenece al grupo de los derivados ácido dietilfenilacético (agentes antitusivos sintéticos)

2.2. ESPECTORANTES Y MUCOLITICOS (2).

Son fármacos que se emplean para promover la eliminación de las secreciones o exudados de la tráquea, bronquios o pulmones y por lo tanto se emplean en el tratamiento de la tos. Estos agentes afectan el tracto respiratorio de dos maneras:

a) Disminuyendo la viscosidad de las secreciones bronquiales y facilitando su eliminación de modo que suprimen los irritantes locales y se alivia la tos seca.

b) Aumentando la cantidad de líquido del tracto respiratorio lo que constituye una acción emoliente sobre la superficie de la mucosa seca, aliviando la tos improductiva.

Afines a los espectorantes son los mucolíticos que son fármacos que tienen la propiedad de disminuir la viscosidad de la secreción bronquial cuando está anormalmente elevada. Cabe señalar sin embargo que existen fármacos como la Bromhexina que poseen ambas propiedades.

Los espectorantes se clasifican en dos grupos:

a) Expectorantes reflejos.

b) Expectorantes de acción directa; incluyendo algunos mucolíticos.

Dentro de los espectorantes de acción directa. Está a la bromhexina la cual es un producto semisintético preparado a partir del alcaloide vasicina, se utiliza como clorhidrato.

Body (1958) clasificó la forma de acción de los fármacos espectorantes en grupos: (3).

- Los que incrementan la secreción bronquial por mecanismo reflejo derivado de la estimulación de la membrana de la mucosa gástrica.

- Los que activan la misma secreción por estimulación directa del centro vagal de la médula oblongada.

- Los que estimulan periféricamente la secreción por receptores colinérgicos en las glándulas bronquiales.

- Los que activan directamente la secreción bioquímica en las glándulas.

Gondonoff (1932) dividió los fármacos expectorantes dentro de dos clases: (3).

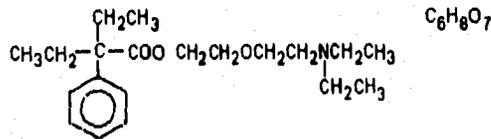
- El secretomotor, los cuales incrementa la secreción mucosa.

- El secretolítico, los cuales licúan la secreción mucosa. No importa la naturaleza del mecanismo de expectoración, el principal requisito para valorar clínicamente un expectorante es considerando ser potente en su efecto secretolítico con mínima toxicidad o acción secundaria.

2.3. CITRATO DE OXELADINA. (4,5,6,7,8).

2.3.1. MONOGRAFIA

- ESTRUCTURA QUIMICA



- FORMULA CONDENSADA

$\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$

- NOMBRE GENERICO

Citrato de oxeladina

- NOMBRES QUIMICOS

Citrato del ácido alfa, alfa-dietil-a-fenilacético dietilaminoetoxietil éster.

Citrato del ácido -2-etil-2-fenilbutirato-2 (2-dietilaminoetoxi)etil éster.

Citrato de 2-(2-dietilamino etoxi)etil,-2 etil-2-fenilbutirato.

- SINONIMOS

Anturel, Pectamol, Tusimol, Paxeladine.

- PESO MOLECULAR

527.6 g.

- DESCRIPCION

Polvo blanco, cristalino inodoro de sabor amargo y olor picante

- SOLUBILIDAD

Soluble en agua y alcohol diluido, insoluble en eter.

- PUNTO DE FUSION

90-91 °C sin descomposición

- ESPECTRO ULTRAVIOLETA (UV).

Longitud de máxima absorción 250 nm en solución ácida, junto con picos subsidiarios a 252 y 264 nm, en el intervalo de 200 a 320 nm. Figura 1.

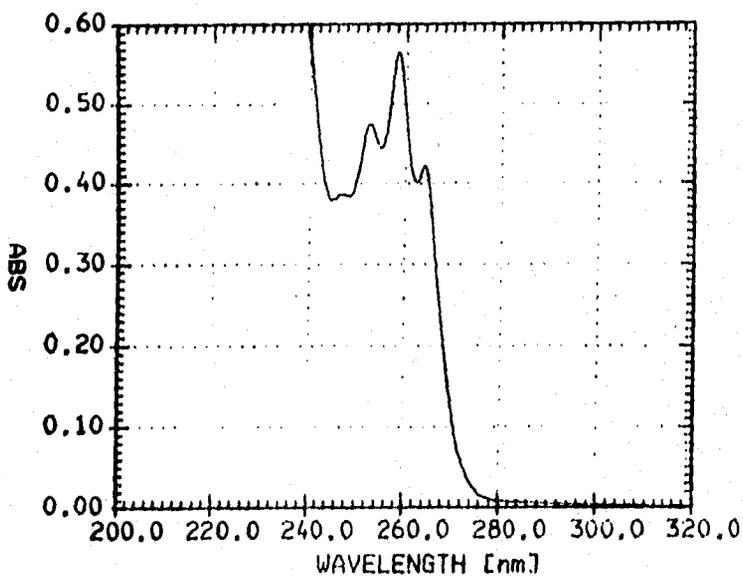


Figura 1. Espectro UV de citrato de oxeladina obtenido en una concentración de 1.6 mg/ml en ácido sulfúrico 0.1 N y una celda de un centímetro de longitud. En un espectrofotómetro de arreglo de diodos HP 8452A

- ESPECTRO INFRARROJO (IR).

El espectro de absorción en el infrarrojo del citrato de oxeladina en pastilla de bromuro de potasio presenta señales a 1731, 1128, 1221, 1100, 700, 1080 cm^{-1} . Figura 2.

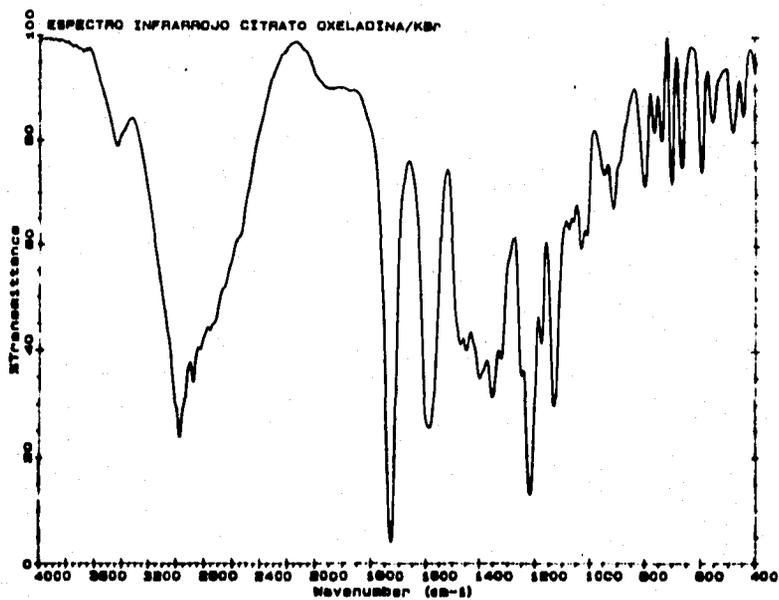


Figura 2. Espectro en el IR de citrato de oxeladina, obtenido en un espectrómetro Nicolet FT-IR 205.

2.3.2. FARMACODINAMIA Y FARMACOCINETICA (2).

- MECANISMO DE ACCION:

El modo de acción antitusivo es central, por depresión del centro de la tos situado en el bulbo; no actúa sobre los centros superiores y no tiene efecto hipnótico en dosis terapéuticas. Tiene propiedades anestésicas locales, tal que podría ser posible un efecto combinado depresivo local y central.

- ABSORCION

El citrato de oxeladina se absorbe bien en el tracto digestivo

- BIOTRANSFORMACION

No se conoce bien la biotransformación de los antitusivos sintéticos.

- ELIMINACION

El fármaco libre y sus metabolitos se excretan especialmente por el riñón.

2.3.3. TOXICIDAD

Se trata de un fármaco poco tóxico. Lo que constituye una ventaja frente a los alcaloides fenantrénicos del opio empleados como antitusivos y no provoca farmacodependencia. Produce algunos trastornos gastrointestinales, como sequedad de boca, náuseas y disminución del apetito, así como trastornos nerviosos los cuales se manifiestan en la aparición de mareos o somnolencia.

Todas esas manifestaciones ceden al disminuir la dosis o suprimir la administración del preparado.

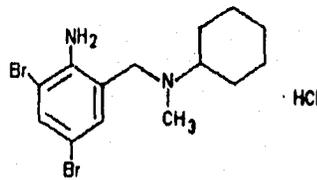
2.3.4. USOS TERAPEUTICOS

Se emplea en la tos improductiva, inútil o seca, sin expectoración o con espectoración escasa, como en el caso de la faringitis traqueitis, bronquitis aguda en período inicial, tosferina, pleuritis, exacerbaciones agudas leves de la bronquitis crónica.

2.4. CLORHIDRATO DE BROMHEXINA (4,5,10,11,12,13).

2.4.1. MONOGRAFIA

- ESTRUCTURA QUIMICA



- FORMULA CONDENSADA



- NOMBRE GENERICO

Clorhidrato de bromhexina

- NOMBRES QUIMICOS

- 2-amino-3,5-dibromobencil(ciclohexil) metil amino clorhidrato
- Cloruro de N-ciclohexil-N-metil-(2- amino-3,5) dibromobencilamonio
- 2-amino-3,5-dibromo-N-ciclohexil-N-metilbencilamino clorhidrato.

- SINONIMOS

Bisolvón, Bisolvomycin, Broncokin.

- PESO MOLECULAR

416.2 g.

- DESCRIPCION

Polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro o casi inodoro.

- SOLUBILIDAD

Ligeramente soluble en agua, en alcohol al 96% y dicloro metano, soluble en ácido acético glacial.

- PUNTO DE FUSION

237 °C sin descomposición

- ESPECTRO ULTRAVIOLETA (UV).

En el intervalo de 280 a 360 nm de una solución de 0.01 % P/V en HCl 0.1 M en metanol exhibe máximos solamente a 317 nm. Figura 3.

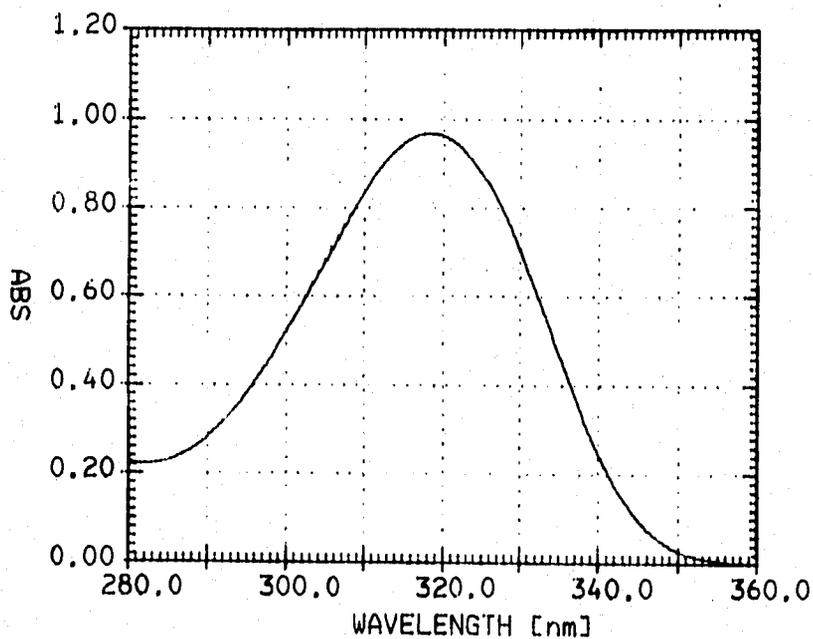


Figura 3. Espectro UV de clorhidrato de bromhexina obtenido en una concentración de 0.1 mg/ml en HCl 0.1 M en metanol y una celda de un centímetro de longitud. En un espectrofotómetro de arreglo de diodos HP 8452A.

- ESPECTRO INFRARROJO (IR).

El espectro de absorción en el infrarrojo del clorhidrato de bromhexina en pastilla de bromuro de potasio presenta señales a 1602, 1031, 1074, 1548, 1122, 857 cm^{-1} . Figura 4.

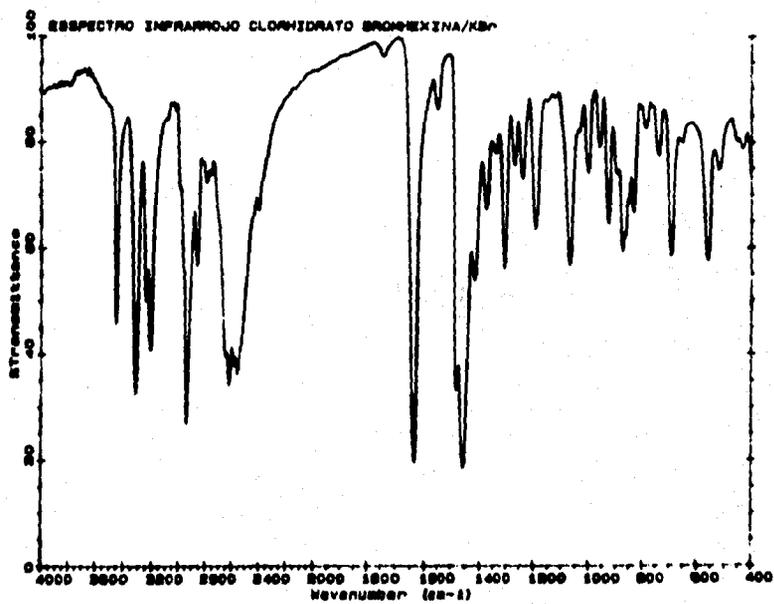


Figura 4. Espectro en el IR de clorhidrato de bromhexina; obtenido en un espectrómetro Nicolet TF-IR 205.

2.4.2 FARMACODINAMIA Y FARMACOCINETICA (2,3,12,14,15).

- MECANISMO DE ACCION

En los casos de bronquitis crónica y aguda, la bromhexina administrada por vía bucal produce un aumento de la cantidad y una disminución de la viscosidad (fluidificación) de las secreciones, debiéndose ésta última a la hidrólisis de las fibras de mucopolisacáridos unidos a las proteínas, demostrado por tinción de extendidos del esputo, que son los que producen una secreción mucosa viscosa. Esta acción mucolítica de la bromhexina la acerca a los fármacos mucolíticos, es también activa por vía bucal; por el hecho de aumentar las secreciones bronquiales, se ha colocado en la clase de fármacos expectorantes.

Bromhexina clorhidrato tiene una actividad mucolítica expectorante sistémica, se ha mostrado la fragmentación de la red de fibras de la glucoproteína ácida en el moco del esputo, decreciendo la viscosidad del mismo e incrementando el volumen del esputo.

Estudios de la mucosa nasal y bronquial con microscopio electrónico sugieren que la bromhexina aumenta la actividad lisosómica, y esto incrementa la secreción de enzimas capaces de hidrolizar la estructura fibrilar mucopolisacárida del moco.

- ABSORCION

La bromhexina se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, la concentración plasmática máxima puede ocurrir después de una hora.

- BIOTRANSFORMACION

En el organismo a nivel del hígado el fármaco sufre una biotransformación compleja por hidroxilación, desmetilación y ciclización. El ambroxol es un metabolito de la bromhexina.

- ELIMINACION

La mayor parte de la dosis de bromhexina es excretada en la orina en muchos metabolitos; solo una pequeña cantidad es excretada en las heces.

2.4.3. TOXICIDAD

Se trata de un fármaco poco tóxico, pueden ocurrir ocasionalmente efectos gastrointestinales como anorexia, náuseas, vómito, gastritis y elevar en el suero los valores de aminotrasferasa.

2.4.5. USOS TERAPEUTICOS

Las indicaciones de este expectorante y mucolítico son en la traqueobronquitis y bronquitis aguda y crónica incluyendo los procesos broncopulmonares obstructivos u obstrucción crónica de las vías aéreas con tos o secreción bronquial viscosa o adherente, con el fin de aumentar su volumen y producir su fluidificación.

2.5. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS (16,17,18,19,20).

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de la muestra entre dos fases, una estacionaria y otra móvil.

La cromatografía es un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema, por el cual, los solutos son separados; consiste fundamentalmente de dos fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección determinada (fase móvil) y en la cual las sustancias individuales exhiben diferentes movimientos debido a la diferencia en adsorción, solubilidad, tamaño molecular etc. La otra está comprendida como un lecho fijo de gran área superficial (fase estacionaria) en la cual los distintos componentes de la muestra interactúan con ella de manera selectiva durante su paso a través de ésta.

La cromatografía de líquidos es una técnica versátil, ya que por medio de ésta es posible realizar separaciones de mezclas basándose en diversas características tales como polaridad de los solutos, coeficientes de partición, peso molecular, naturaleza iónica, o su capacidad para formar complejos de afinidad. Esta técnica acoplada a sistemas electrónicos y mecánicos permite separar, aislar y cuantificar los componentes de una mezcla de sustancias químicas.

En la cromatografía de líquidos la separación tiene lugar en una columna empacada. La fase estacionaria puede ser un sólido con capacidad adsorptiva o un soporte inerte revestido de una capa líquida, mientras que la fase móvil es un líquido puro o una mezcla de ellos, o una mezcla de soluciones amortiguadoras.

En la cromatografía en columna, la fase móvil fluye a través de 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 y de esta manera se logra que cada componente de la mezcla sea eluido de la columna como un compuesto puro, disuelto en la fase móvil.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidos repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

La cromatografía de líquidos de alta resolución ha venido a ser una de las técnicas más importantes en el desarrollo de métodos para análisis de fármacos en diversas formas farmacéuticas y en fluidos biológicos, por su alta selectividad y amplio intervalo de sensibilidad.

Existen varias maneras de clasificar a la cromatografía de líquidos, basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil:

1). Cromatografía Líquido-Líquido (partición).- Se basa en la distinta solubilidad que presentan las moléculas 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.

2) Cromatografía Líquido-Sólido.- (adsorción).- En este proceso se presenta un fenómeno de adsorción-desorción, en el cual la fase estacionaria es un adsorbente y 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 en la superficie de un sólido o fase estacionaria.

3). Cromatografía de Exclusión.- El relleno de la columna es de un material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites con los que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros y quedan retenidas en tanto que las grandes no.

4). Cromatografía de Intercambio Iónico.- El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa con muestras iónicas o ionizables, se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina cambiadora de iones.

La cromatografía de líquidos también se clasifica según sea la polaridad relativa de las dos fases.

1). Cromatografía en Fase Normal.- El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (sílice) y la fase móvil es no polar (n-hexano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

2). Cromatografía en Fase Inversa o Fase Reversa.- Es el proceso inverso en el cual el lecho estacionario es de naturaleza no polar (hidrocarburo) mientras que la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o metanol. En cuanto más no polar sea la muestra mayor será su retención.

2.5.1. CROMATOGRAFIA DE PAR IONICO EN FASE REVERSA (22).

En la cromatografía de par iónico, el contraión se transporta en la fase móvil. La fase estacionaria en un solvente adecuado se puede aplicar mecánicamente como un recubrimiento sobre un soporte adecuado. En la práctica, la mayoría de las aplicaciones utilizan empaques para columnas caracterizadas por una fase estacionaria que está enlazada químicamente al soporte el cual es usualmente sílice. Este tipo de empaque de la columna evita completamente los problemas de inestabilidad asociados con recubrir mecánicamente las fase estacionaria.

La técnica de la cromatografía de par iónico introduce una manipulación extra en un análisis cromatográfico por lo que generalmente debería utilizarse en donde se tiene una pobre resolución, retención, y prolongación del pico máximo son inevitables. Otras razones válidas para aplicar la cromatografía de par iónico se encuentran cuando se requiere aumentar la sensibilidad del detector o se requiere mejorar la resolución de una mezcla tanto de compuestos ionizables como no ionizables. En este último caso la cromatografía de par iónico introduce una selectividad mayor en el sistema cromatográfico.

El éxito de la cromatografía de par iónico depende del control del factor de capacidad (K') de cada soluto en la muestra de prueba; K' depende grandemente de tres características principales del sistema cromatográfico: la fase estacionaria, la fase móvil y el contraión.

- SELECCION DEL CONTRAION.

El tipo de contraión, su tamaño y su concentración son importantes para la separación. Este depende del tipo de sustancia por analizar y su clasificación como base fuerte (pK_a mayor 8) ó débil (pK_a menor 8).

En la cromatografía de par iónico de fase inversa es posible seleccionar un contraión de cualquiera de muchos compuestos similares, las diferencias son generalmente el tamaño de la porción hidrofóbica del contraión. La hidrofobicidad de este es importante para optimización de una separación, mientras más alta es la hidrofobicidad del contraión más alta será el factor de capacidad de la sustancia.

El efecto útil de la hidrofobicidad debe de aplicarse con precaución dado que la cadena lateral puede dominar el comportamiento de retención del par iónico. Esto es particularmente importante donde se requiere la separación de sustancias por analizar con características estructurales similares.

- CONCENTRACION DEL CONTRAION.

La concentración óptima de un contraión depende de varios factores que operan durante una separación. La formación de racimos o agrupamientos de las moléculas del contraión comienza hacer significativa a medida que la concentración de éste aumenta más allá de cierto nivel; por lo cual reduce la eficiencia de la formación de par iónico al presentarse menos moléculas del contraión que pueden formar complejos con la sustancia por analizar.

Generalmente los contraiones con grupos alquilo grandes deberían utilizarse aproximadamente a una concentración de 0.005 M por ejemplo como las sales de lauril. Los contraiones más pequeños tales como el sulfonato de heptano no forman agrupamientos en forma significativa y de ésta forma se pueden utilizar a concentraciones mas elevadas como 0.01 M ó mayores. En el último caso la solubilidad del contraión en la fase móvil es la consideración principal.

- EFECTO DEL pH

Muchos solutos y reactivos de contraión pueden dar lugar a pares de iones que se distribuirán entre las fases móvil y estacionaria, debido al equilibrio de ionización del hidrógeno, del pH de la fase acuosa. Para solutos ácidos con pK_a menor al pH de la fase acuosa el soluto se repartirá como pares de iones. Donde el pK_a es mayor al pH los solutos ácidos se dividirán como los ácidos libres; lo inverso procedera para solutos básicos. Ramificaciones importantes de esto son que la formación de pares iónicos no puede ser completa y puede causar picos doblados o ensanchados debido a que el pH varía por tener mal amortiguamiento además de que los tiempos de retención pueden variar de una corrida cromatográfica a otra.

- EFECTO DE LA TEMPERATURA.

La temperatura en la cromatografía de par iónico influye en el comportamiento de un soluto que se divide entre dos fases miscibles. Un incremento en la temperatura de la columna estará, generalmente, asociado con una disminución en los valores de K' de los pares iónicos. Una amplia variación de la temperatura ambiente dara posiblemente como resultado mala reproducibilidad de los valores de K' . La temperatura se puede utilizar para ayudar a optimizar una separación, la consideración práctica limitara un intervalo de temperatura hasta un perfil más bajo que sea mayor que el límite superior ambiental y un perfil más alto que no amenace la estabilidad de la fase estacionaria. La combinación de temperaturas más altas y de aminas terciarias y cuaternarias puede reducir la vida de un empaque del tipo de hidrocarburo unido a sílice. Un límite superior seguro con esa combinación sería de 60 °C.

2.5.2. CONCEPTOS BASICOS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA (17,20,21).

TIEMPO DE RETENCION (t_r): Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico.

TIEMPO MUERTO (t_o o t_a): Es el tiempo requerido para eluir un compuesto no retenido en la columna y se determina midiendo el tiempo comprendido entre el punto de inyección y el máximo del pico cromatográfico, correspondiente al compuesto no retenido.

TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO (t'_r): Es la diferencia entre t_r y t_o , es decir, durante el recorrido de un compuesto a lo largo de la columna las moléculas del compuesto invierten parte del tiempo en la fase móvil y parte en la fase estacionaria. Mientras están en la fase móvil se desplazan a su misma velocidad, en tanto que mientras permanecen en la fase estacionaria están estáticas, interaccionando con ésta y de esta forma se retrasan. Por esta razón t'_r representa el tiempo que el compuesto permanece en la fase estacionaria y se define de la siguiente forma:

$$t'_r = t_r - t_o$$

PLATOS TEORICOS: Son etapas de partición o distribución que sufren las moléculas de los compuestos durante su recorrido a lo largo de la columna cromatográfica.

NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N): Es una medida de la eficiencia de la columna, cuanto mayor sea N , más eficiente será la columna se mide de acuerdo a la siguiente expresión:

$$N = 16 \frac{t_r^2}{W_b}$$

O bien cuando se determina la anchura del pico cromatográfico al 50% se utiliza la siguiente expresión:

$$N = 5.54 \frac{t_r^2}{W_b}$$

ANCHURA DE LA BASE DEL PICO CROMATOGRAFICO (W_b): Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica. Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos. Figura 5.

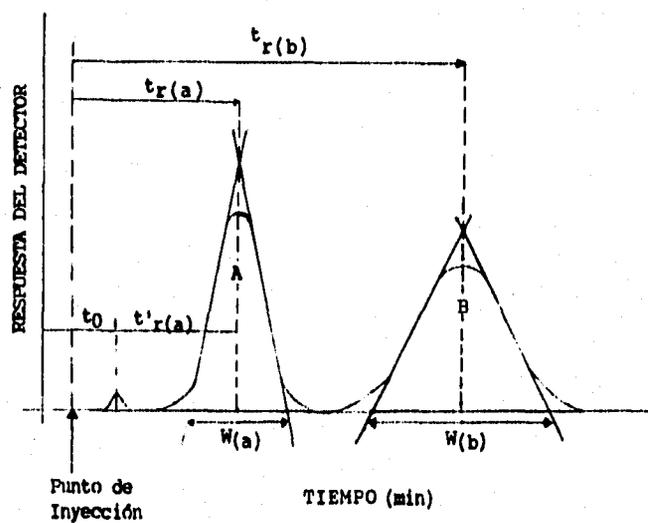


Figura 5. Representación de un cromatograma típico.

ALTURA EQUIVALENTE DE UN PLATO TEORICO (AEPT): Es la longitud de columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria se representa por:

$$AETP = \frac{L}{N}$$

Donde L es la longitud de la columna, expresada habitualmente en milímetros

FACTOR DE CAPACIDAD (K'): Es una constante termodinámica y mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Este indica el tiempo durante el cual un compuesto puede ser retenido en la columna. Se define de la siguiente manera:

$$K = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

RESOLUCION (R): Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos. Se determina con la siguiente expresión:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_a + W_b}$$

Generalmente, un valor de "R" igual a 1.5 o mayor significa que los picos están separados totalmente.

SELECTIVIDAD (α): Es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase estacionaria.

Valores elevados, significa mejores separaciones y se le determina con la siguiente expresión:

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

2.5.3. INSTRUMENTOS PARA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR) (19,20).

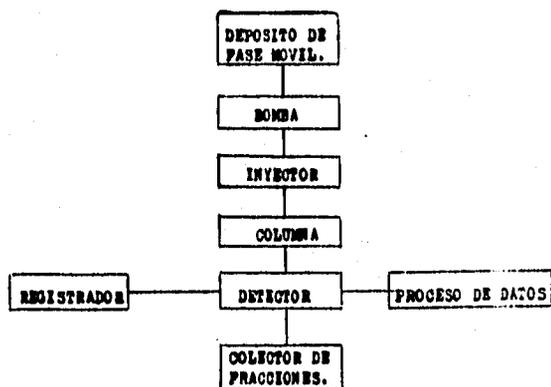
Actualmente los instrumentos requeridos para CLAR, incluyen gran versatilidad y complejidad y continuan en proceso de avance y modernización. Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son: Bomba, inyector, columna, detector y registrador.

La columna se encuentra empacada de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil.

El proceso cromatográfico empieza por la inyección de la muestra al sistema. La separación ocurre al bombear la fase móvil y la muestra disuelta en ésta a través de la columna, cada compuesto que eluye de la columna es detectado ya sea por un detector universal o por un selectivo, dependiendo de las propiedades de los compuestos a analizar.

La respuesta del detector a la presencia de cada componente es registrada como un cromatograma. Esta señal producida por el detector se manifestará en forma de picos gaussianos representando la concentración de los componentes eluidos.

Figura 6. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de de líquidos de alta resolución.



2.6. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (21,23,24,25).

En los últimos años, se han venido realizando muchos cambios significativos en la forma de apreciar y conseguir que un método analítico desarrollado sea evaluado o validado para comprobar su confiabilidad o funcionalidad.

Existen muchas formas de validar un método analítico, ya que hay una gran variedad de experimentos que pueden ser utilizados para este fin.

El seleccionar cuales serán los puntos a validar en un método analítico, depende generalmente de la aplicación que tenga el método, de las necesidades particulares de cada laboratorio, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de la persona que lo realiza.

La validación de un método analítico, se define 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. La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método en particular esta basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

2.6.1. LINEALIDAD.

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

La linealidad del método se evalúa por un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, para la relación concentración adicionada contra concentración cuantificada, obteniéndose los parámetros tales

como pendiente (m), ordenada al origen (b); donde m y b no deben ser estadísticamente diferentes de 1 y 0 respectivamente y coeficiente de determinación r^2 mayor o igual 0.98. La evaluación de la pendiente y la ordenada al origen se realiza por contraste de hipótesis para la relación crítica bilateral con un nivel de significancia (α) igual a 0.05 a través de un estadígrafo "t de student".

2.6.2. EXACTITUD.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina que la media no sea diferente del 100%, por medio de una prueba de hipótesis, con un nivel de significancia (α) igual 0.050 a través de un estadígrafo "t de student".

2.6.3. PRECISION.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los 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 de coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

- Repetibilidad.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio, etc.)

- **Reproducibilidad.**- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos).

2.6.4. ESPECIFICIDAD.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes que estén presentes en la muestra (excipientes, impurezas, compuestos de degradación etc.).

La especificidad de un método analítico se demuestra al comparar los resultados del análisis de muestras que contienen impurezas, excipientes, o productos de degradación o de formación, con muestras que carecen de estos. Cuando las impurezas o productos de degradación o de formación no son conocidas, la especificidad se demuestra degradando entre 10 y 30 % de la molécula de interés, obteniendo así los productos de degradación a través de reacciones simuladas y controladas de degradación. Para esto se someten a degradación, por las vías más comunes hidrólisis ácida y básica, oxidación y fotólisis a:

- Principios Activos
- Placebo
- Formulación

2.6.5. TOLERANCIA.

Es la determinación de los factores que afectan al sistema de medición. Se lleva a cabo cuantificando una muestra homogénea por triplicado y por la evaluación de los parámetros cromatográficos de seis inyecciones de la solución de referencia, modificando las condiciones

normales de operación, tales como proporciones de los disolventes, concentración de par iónico, pH, etc. y observando de qué manera se alteran los resultados, ésto con el fin de determinar los puntos críticos del sistema de análisis.

2.6.6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Es el tiempo mediante el cual una muestra lista para su análisis conserva su integridad físicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

2.6.7. LIMITE DE CUANTIFICACION.

Es aquella concentración del compuesto de interés en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas; es un parámetro para valoraciones cuantitativas para niveles bajos de compuestos en muestras, tales como impurezas en materias primas y productos de degradación en productos terminados (método de categoría II y III). Según USP 23. (26).

2.6.8. LIMITE DE DETECCION.

Es la concentración más baja del compuesto de interés en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de detección es un parámetro para pruebas límites. (determinaciones de la categoría II).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Actualmente se considera que una parte integral del desarrollo o implementación de un método analítico es la validación del mismo, principalmente porque es un requisito ante la secretaría de salud y debe probarse para establecer de manera clara y objetiva, que el método de estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Debido a que actualmente no se cuenta con un método analítico adecuado para la determinación de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina, presentes en jarabe, se requiere entonces de un método versátil, rápido y confiable para el análisis, por lo que la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), es una alternativa para separar ambos principios activos en el menor tiempo posible, con gran confiabilidad en los resultados.

Debido a que se cuenta con la infraestructura y a las ventajas que ofrece la cromatografía de líquidos de alta resolución, se desea desarrollar un método analítico que nos permita la cuantificación simultánea de los principios activos antes mencionados, asegurando completamente la especificidad para ambos fármacos. Una vez obtenido, se llevará a cabo la validación del mismo para poder utilizarlo como método de rutina para control de calidad y como método indicador de estabilidad.

4. OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Obtener un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina en jarabe para utilizarlo como control de producto terminado y estudios de estabilidad.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1). Caracterizar las materias primas para emplearlas como sustancias patrón de referencia secundario.
- 2). Reproducir las condiciones experimentales del sistema cromatográfico de un método analítico reportado para compuestos aminos por CLAR para emplearlas en la separación y cuantificación de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina en jarabe.
- 3). Establecer el procesamiento de las muestra.
- 4). Evaluación del sistema propuesto, para emplearlo en estudios de estabilidad, a través de reacciones simuladas de degradación de las materias primas y demostrando su especificidad de estas, por medio de un análisis espectral de los picos eluidos y cuantificando a diferentes longitudes de onda en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución equipado con un detector de arreglo de fotodiodos.
- 5). Proponer el método de análisis.
- 6). Validar el método propuesto.

5. HIPOTESIS:

En base a las características estructurales de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina, se podrá obtener un método analítico que separe y cuantifique ambos compuestos por cromatografía de líquidos de alta resolución; el cual nos permitirá el empleo de éste como método analítico para control de calidad y para estudios de estabilidad, mediante la comprobación de la especificidad del método a través de la degradación de las materias primas, formulación y placebo y cuantificando a diferentes longitudes de onda, realizando un análisis espectral U.V. de los picos eluidos con un detector de arreglo de fotodiodos. Demostrando su confiabilidad a través de su validación.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. EQUIPO E INSTRUMENTOS.

- Bomba Waters modelo 510 y 610 para cromatógrafo de líquidos
- Inyector manual Beckman con loop de 20µl.
- Inyector manual Waters modelo U6K para cromatógrafo de líquidos.
- Inyector automático WISP modelo 712 Waters.
- Inyector automático WISP modelo 700 Waters.
- Detector Waters 490 de longitud de onda variable para cromatógrafo de líquidos.
- Detector Waters 480 de longitud de onda variable para cromatógrafo de líquidos.
- Detector Waters 990 de arreglo de fotodiodos para cromatógrafo de líquidos
- Integrador Waters modelo 745.
- Integrador HP modelo 3390A y 3396A.
- Waters 600E System Controller.
- Printer Plotter Waters modelo 5200.
- Prinwriter NEC CP6.
- Balanza analítica Mettler AE 260 Delta Range.
- Baño de Ultrasonido Cole-Palmer modelo 8851.
- Potenciómetro Beckman Modelo P45 pH meter.
- Agitador magnético. Thermolyne, Nuova II.
- Agitador vortex. Thermolyne Tipe 37600 Mixer.

6.2. MATERIAL.

- Microjeringa de 25,50 y 100 μ l Hamilton.
- Equipo de filtración Millipore.
- Membranas de filtración Millipore tipo GVWP de 0.22 μ m.
- Pipetas Eppendorf de descarga múltiple.
- Matraz volumétrico de 25 y 50 ml.
- Vaso de precipitado de 1000 ml.
- Pipetas volumétricas de 2 y 10 ml.

6.3. REACTIVOS:

- Agua grado HPLC.
- Metanol grado HPLC.
- Metanol grado reactivo.
- Hidróxido de amonio grado reactivo.
- Acido fosfórico grado reactivo.
- 1- Octanosulfonato de sodio grado reactivo
- Materias Primas: citrato de oxeladina.
clorhidrato de bromhexina.

6.4. METODO

6.4.1. CARACTERIZACION DE LAS MATERIAS PRIMAS:

Con el objeto de obtener sustancias de referencia de trabajo de una pureza óptima; se procedió a la certificación de las materias primas citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina.

El citrato de oxeladina es un compuesto que no lo describe la farmacopea por lo que para su caracterización y la obtención de la sustancia de referencia se realizó una revisión bibliográfica, que conjuntamente con la información de proveedores se establecieron pruebas de identificación, de pureza y valoración, las cuales se ensayaron en el laboratorio con diferentes lotes de varios proveedores; previo a la certificación de uno de ellos.

El clorhidrato de bromhexina, se certificó de acuerdo a las pruebas que indica la farmacopea británica (B.P.) (10).

6.4.2. DESARROLLO DEL METODO:

Basandose en un artículo para antihistamínicos, descongestionantes y supresivos de la tos, en el cual se utiliza la cromatografía de líquidos de alta resolución; se estableció lo siguiente:(1).

- Uso de cromatografía de pares de iones.
- Uso de modificadores orgánicos.
- Cromatografía en fase reversa con una columna C18.

Basandose en los principios antes descritos y utilizando el material, equipos y reactivos del laboratorio se propuso el siguiente sistema cromatográfico:

Fase Móvil I : Octanosulfonato de sodio 0.018 M en Metanol (solucion A):Agua:THF:

Ac.Fosfórico 85%; (68:29:04:0.1) pH ajustado a 3.8 .

Columna: Beckman C18 ODS de 25 cm de longitud por 4 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 μ

Longitud de onda: 220 nm.

Velocidad de flujo: 1.3 ml/min.

Volumen de inyección: 25 μ l

Para seleccionar la longitud de onda de trabajo para los compuestos de interés se realizó un barrido espectrofotométrico en un instrumento de arreglo de diodos, donde se encontró que a 220 nm ambos compuestos presentaban una adecuada absorbancia; ya establecida la longitud de onda, se prepararon soluciones de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina sustancias patrón de referencia secundario en metanol grado reactivo a diferentes concentraciones, inyectándose al sistema antes descrito.

Los resultados a los que se llegaron se muestran en la figura 7.

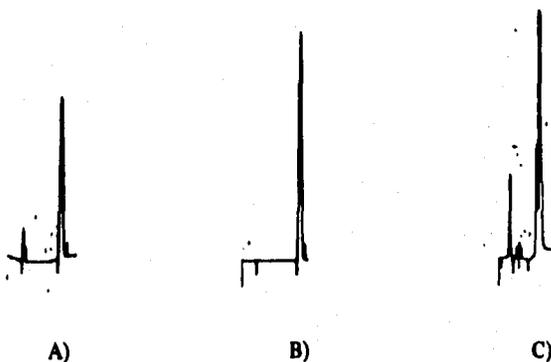


Figura 7. Cromatogramas representativos de: A) citrato de oxeladina; B) clorhidrato de bromhexina; C) mezcla de ambos fármacos, obtenidos con la fase móvil I.

Como se observa en la figura 7 se obtuvo respuesta adecuada a la concentración de 240 mcg/ml para citrato de oxeladina y 120 mcg/ml para clorhidrato de bromhexina, pero al mezclar ambos compuestos no se resolvieron.

Con estos resultados se realizaron modificaciones a la fase móvil 1, con el objeto de encontrar condiciones cromatográficas con los cuales se lograra separar ambos principios activos; dichos cambios consistieron en lo siguiente:

- Eliminación del THF y ajuste de la fuerza de elución con metanol.
- Aumento y disminución de pH.

Las fases móviles probadas en esta etapa fueron:

- Fase Móvil 2: solución A: Agua:Ac.fosfórico al 85 % (70:30:0.1) pH ajustado a 3.8.
- Fase Móvil 3: solución A: Agua:Ac.fosfórico al 85 % (70:30:0.1) pH ajustado a 3.0.
- Fase Móvil 4: solución A: Agua:Ac.fosfórico al 85 % (70:30:0.1) pH ajustado a 5.0

Los resultados generales a los que se llegaron se muestran en la figura 8.

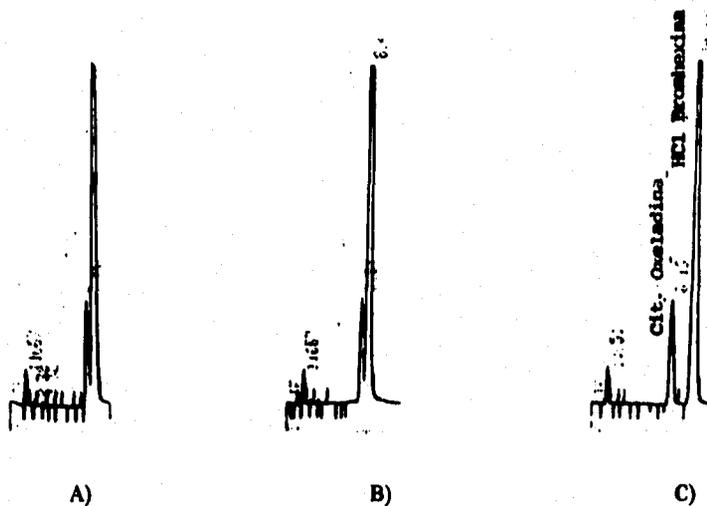


Figura 8. Incisos A, B y C cromatogramas representativos de la mezcla de ambos fármacos obtenidos al evaluar las fases móviles 2, 3 y 4 respectivamente, como se observa en los cromatogramas A y B no se obtuvo una resolución adecuada entre los compuestos de interés con las fases móviles 2 y 3. Con lo que respecta a la fase móvil 4 se obtuvo una resolución mayor a 1.5 además de un tiempo de análisis no mayor de 15 min.

Con base en estos resultados, se realizaron pruebas para evaluar la especificidad a productos de degradación de materias primas, formulación y placebos. Sometidos a degradación ácida, básica y oxidación utilizando la fase móvil 4.

Los resultados obtenidos mostraron que este sistema es inespecífico para productos de degradación obtenidos en medio ácido para las materias primas. Con respecto a la degradación básica y la oxidación los productos de degradación no interfieren con los compuestos de interés. Figura 9.

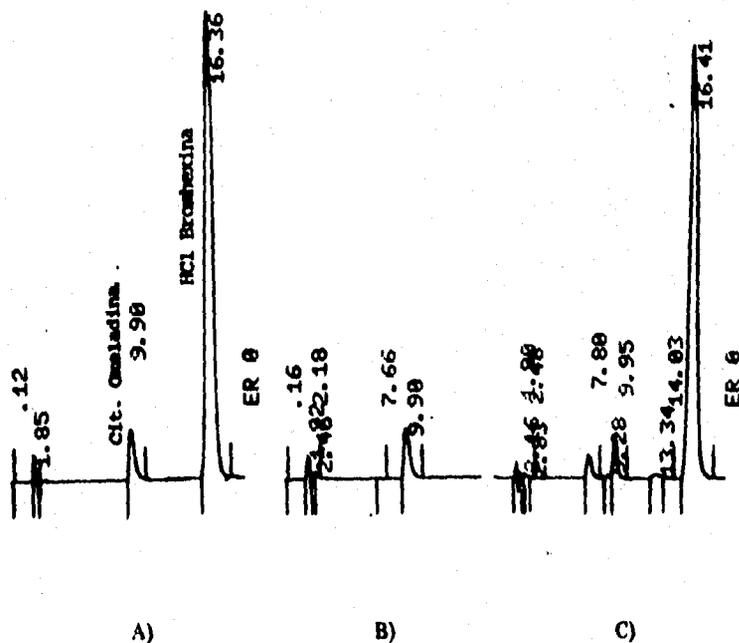


Figura 9. Cromatogramas representativos de la degradación en medio ácido; A) citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina (sustancia patron de referencia SPR), B) citrato de oxeladina en HCl 1N, C) clorhidrato de bromhexina en HCl 1N obtenidos con la fase móvil 4.

Para obtener un sistema específico se, procedió a modificar la fase móvil 4, dichas modificaciones consistieron:

- Aumento de pH (en 0.1 unidades), ya que se tenía el antecedente experimental de que aumentando este, aumentaba la resolución de los compuestos de interés .
- Aumento de la concentración molar (en 0.004 M) del par iónico, para buscar un factor de capacidad mayor en los compuestos de interés.
- Cambios en la proporción del solvente orgánico y el agua, para ajustar la elución de los compuestos.

Las fases móviles probadas en esta etapa fueron:

- Fase Móvil 5: Octanosulfonato de sodio 0.022 M en Metanol (solución B):Agua:Ac. Fosfórico al 85% (70:30:0.1) pH ajustado a 5.5.
- Fase Móvil 6: Solución B:Agua:Ac.Fosfórico al 85% (65:35:0.1) pH ajustado a 5.5.
- Fase Móvil 7: Solución B:Agua:Ac.Fosfórico al 85%(68:32:0.1) pH ajustado a 5.6.
- Fase Móvil 8: Octanosulfonato de sodio 0.018 M en Metanol (solución C):Agua:Ac. Fosfórico al 85% (68:32:0.1) pH ajustado a 5.5.

Los resultados generales a los que se llegaron se muestran en la figura 10, 11, 12 y 13 respectivamente.

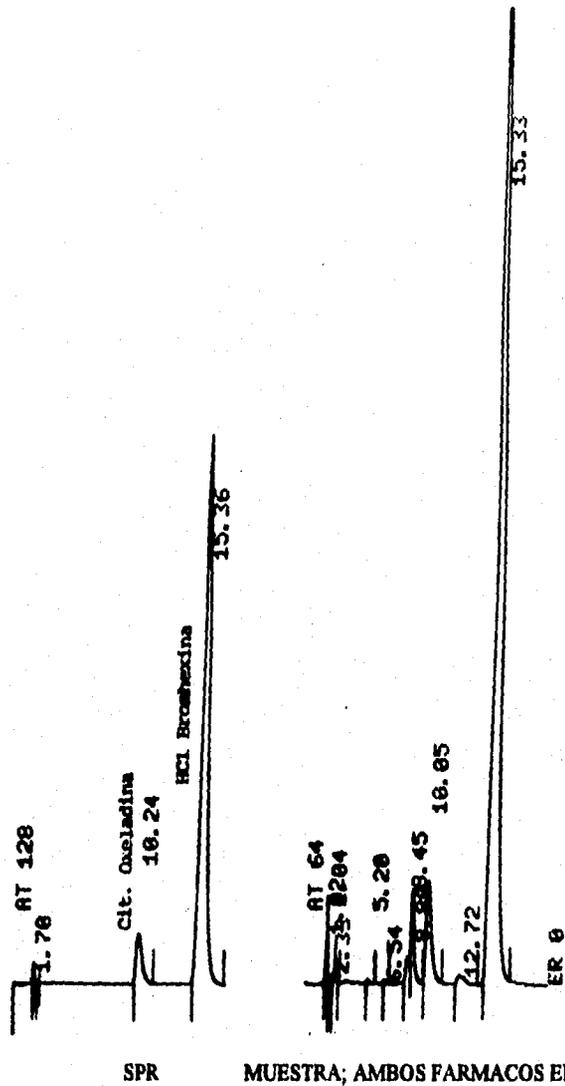


Figura 10. Cromatograma representativo de la degradación ácida de las materias primas obtenido al evaluar la fase móvil 5.

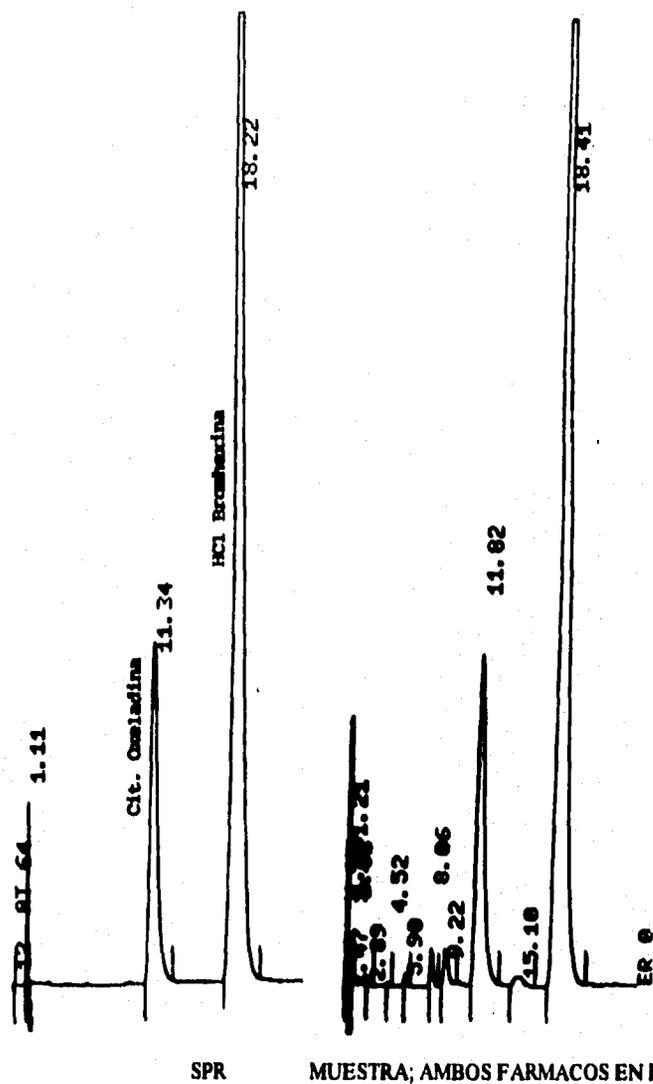


Figura 11. Cromatograma representativo de la degradación ácida de las materias primas obtenido al evaluar la fase móvil 6.

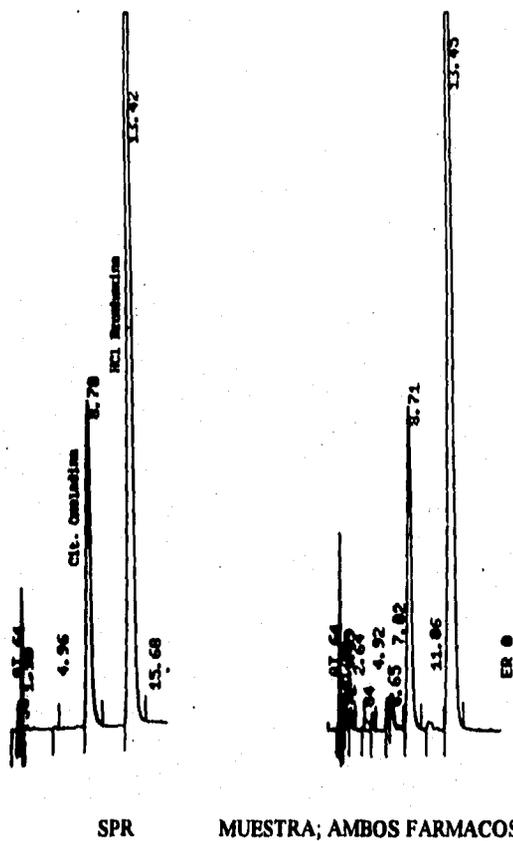
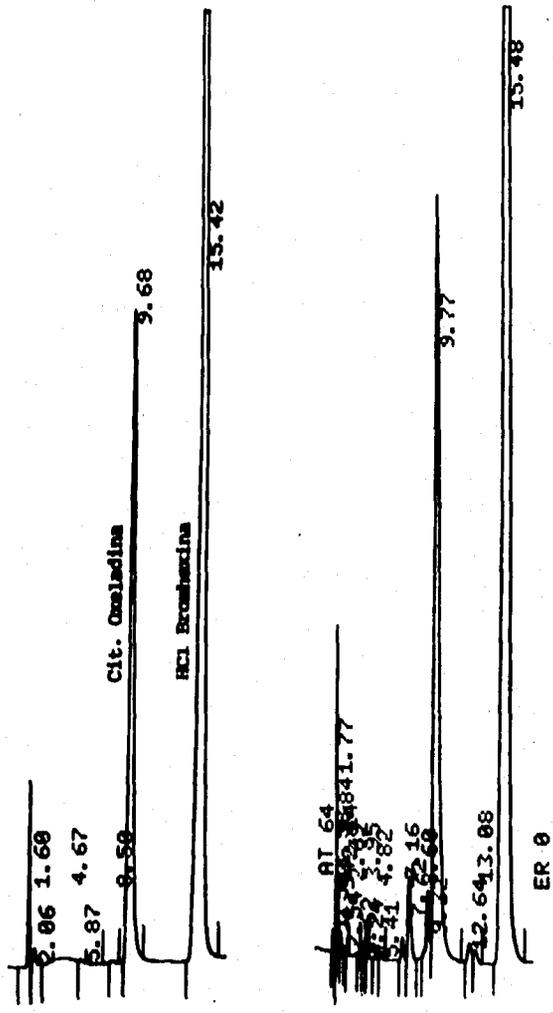


Figura 12. Cromatograma representativo de la degradación ácida de las materias primas obtenido al evaluar la fase móvil 7. Con ésta se obtuvo una separación mayor entre los degradantes y los principios activos de interés, con respecto a la obtenida con las fases móviles 5 y 6 respectivamente. Los tiempos de retención obtenidos fueron de 8.70 y 13.42 respectivamente lo cual se considero adecuado a tiempo de análisis.



SPR MUESTRA; AMBOS FARMACOS EN HCl 1N

Figura 13. Cromatograma representativo de la degradación ácida de las materias primas obtenido al evaluar la fase móvil 8. Con esta no se tuvo separación entre los degradantes y el citrato de oxeladina (principio activo de interés).

Ya resuelto el problema de la especificidad se procedió a elegir el estándar interno, a probar la linealidad del sistema y establecer el procesamiento de las muestras

Se probaron diferentes sustancias; de estas la sustancia que presentó un tiempo de retención cercano y que se resolvía de los compuestos de interés fue el dipropionato de beclometasona. Después de realizar algunas pruebas, se observó que el sistema es altamente afectado por variaciones de temperatura, siendo el dipropionato de beclometasona (estándar interno) el que era el afectado llegando incluso a no resolverse con el clorhidrato de bromhexina; por tal motivo se decidió mantener constante la temperatura de la columna, eligiéndose la temperatura de 47.5 °C, (figura 14), a esta temperatura, se obtuvo resolución entre principios activos y estándar interno e inversión de tiempos de retención entre clorhidrato de bromhexina y dipropionato de beclometasona además, se presentaban tiempos de retención mas reproducibles.

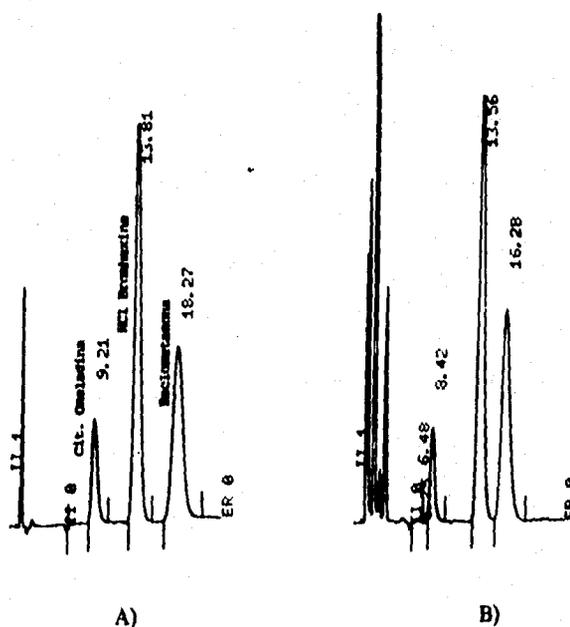


Figura 14. Cromatogramas representativos de : A) sustancia patron de referencia a temperatura ambiente, B) muestra de la formulación a temperatura ambiente.

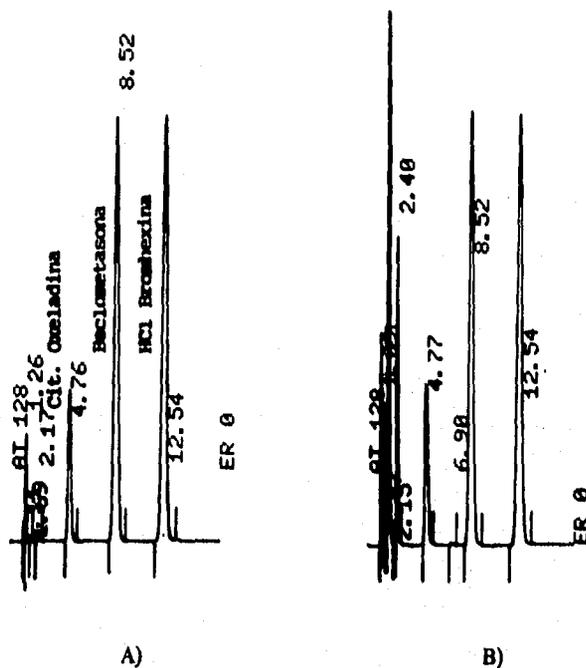


Figura 15. Cromatogramas representativos de: A) sustancia patron de referencia a temperatura de 47.5 °C, B) muestra de la formulación a temperatura de 47.5°C.

En cuanto a la linealidad del sistema para citrato de oxeladina se probaron soluciones en fase móvil de 48 a 144 mcg/ml y de 12 a 72 mcg/ml para clorhidrato de bromhexina, se les realizó un análisis de regresión lineal, se evaluó carencia de ajuste y la ordenada al origen por prueba t de student. Ambos principios activos demostraron ser lineales en los intervalos probados; pero el citrato de oxeladina mostro que la ordenada era estadísticamente diferente de cero. Por lo cual se decidió emplear una curva de calibración a tres puntos en lugar de calibración a un solo nivel; para ambos principios activos.

Con respecto al procesamiento de la muestra esta se realizó por dilución directa en fase móvil, considerando el 100% para ambos principios activos de la cantidad etiquetada.

EL DESARROLLO LLEVO A LO SIGUIENTE:**- SISTEMA CROMATOGRAFICO:**

Columna ultrasphere C18 Beckman de 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud, con partículas de 5 micras de diámetro.

Temperatura de la columna: $47.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Velocidad de flujo: 2.0 ml/min.

Detector : U.V.

Longitud de onda: 220 nm.

Volumen de inyección: 25 μl .

Modo de integración: Alturas.

Fase Móvil: Octanosulfonato de sodio 0.022 M en Metanol:Agua:Ac.fosfórico al 85%; (68:32:0.1) pH ajustado a 5.6 ± 0.05 .

- CURVA DE CALIBRACION:

Preparar en fase móvil las siguientes soluciones: citrato de oxeladina (cit. oxeladina), clorhidrato de bromhexina (HCl. bromhexina) y dipropionato de beclometasona (estandar interno). Como se indica en la siguiente tabla:

NIVEL	CONCENTRACION FINAL EN $\mu\text{g}/\text{mL}$		
	estandar	cit. oxeladina	HCl. bromhexina
80.0 %	78.8	38.4	100
100.0 %	96.0	48.0	100
120.0 %	115.2	57.6	100

Con los datos obtenidos de la curva de calibración realizar un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, considerando la concentración en ($\mu\text{g/ml}$) como "x" y la altura relativa como "y" y obtener la ecuación de la recta para cada uno de los principios activos

- METODO.

Determinar la densidad de la muestra.

Pesar 2.0 g de la muestra en un matraz volumétrico de 25 ml, agregar 1.0 ml de estándar interno, llevar a volumen con fase móvil y mezclar.

Inyectar 25 μl al cromatógrafo e interpolar la altura relativa de cada uno de los compuestos en su respectiva curva patrón y obtener la concentración de los principios activos en la solución.

Hacer corrección por densidad y peso utilizado de la muestra para conocer la concentración en gramos de cada principio activo por cada 100 ml de jarabe.

6.5. VALIDACION DEL METODO:

6.5.1. LINEALIDAD:

La linealidad del método fue determinada preparando soluciones de placebos adicionados a cinco diferentes concentraciones, correspondientes al 80, 90, 100, 110, y 120 % de lo etiquetado para citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina respectivamente. Cada principio activo se evaluó por separado, manteniendo al 100 % el otro principio activo; cada nivel se preparó por triplicado.

De los resultados concentración adicionada-concentración cuantificada se determinó el coeficiente de correlación y determinación, la ordenada al origen y la pendiente y la evaluación de la no diferencia de estas a cero y uno respectivamente por constrate de hipótesis, através de una prueba t de student al 95% de confianza, y n-2 grados de libertad.

6.5.2. EXACTITUD:

La exactitud del método se determinó expresando los resultados de linealidad en porcentaje cuantificado, además con seis placebos adicionados de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina ambos a la concentración de 100%. Se evaluó que el promedio de porcentaje cuantificado no fuera significativamente diferente al 100 %, sus límites de confianza, todo esto a un nivel de significancia al 0,05.

6.5.3. PRECISION:

Repetibilidad: Se determinó con las muestras en las cuales evaluó la exactitud al 100% y en el intervalo de trabajo. Para ambos principios activos respectivamente. Se determinó la repetibilidad, calculandose como coeficiente de variación (CV%).

Reproducibilidad: Se hizo un estudio de reproducibilidad utilizando un lote de jarabe de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina de 0.0120/0.060 g/100 ml, el cual fué analizado por triplicado de manera independiente por 2 analistas en 2 días. Se determinó el coeficiente de variación global para los 2 analistas.

6.5.4. ESPECIFICIDAD:

Se determinó la especificidad del método degradando las materias primas (MP) citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina, formulación (F), y placebo (P), bajo las condiciones descritas en la siguiente tabla:

MUESTRA	AGENTE DEGRADANTE	CONDICIONES
MP, P	Acido clorhídrico 1N	121°C, 1hr. Autoclave
F	Acido clorhídrico 1N	45°C, 20 hr. 50 % H.R.
MP, F, P	Hidróxido de Sodio 1N	121 °C, 1hr Autoclave
MP, F, P	Peróxido de hidrógeno (30%)	45°C, 20 hr 50 % H.R.

Las muestras se cuantificaron por duplicado y en forma independiente. Se valoró el citrato de oxeladina y el clorhidrato de bromhexina a través del método propuesto empleando para ello dos longitudes de onda distintas incluyendo la longitud de onda de trabajo (220 nm), para citrato de oxeladina; para clorhidrato de bromhexina se empleó cuatro longitudes de onda, incluyendo la longitud de trabajo.

Se determinó pureza cromatográfica e identificación de los picos eluidos a través de un análisis espectral, esto se realizó para cada una de las condiciones de degradación antes descrita.

6.5.5. ESTABILIDAD:

La estabilidad se realizó analizando tres muestras independientes almacenadas estas durante 12 horas bajo las siguientes condiciones: Temperatura ambiente en ciclos normales de luz y oscuridad, Temperatura de refrigeración a 5°.

6.5.6. TOLERANCIA:

Para evaluar la tolerancia se realizaron diferentes modificaciones a variaciones de temperatura de la columna y pH de la fase móvil, las cuales se muestran en la siguiente tabla:

MODIFICACION	TIPO DE MODIFICACION
-	Condiciones Normales 47.5°C, pH 5.60
1	Temperatura a 47°C
2	Temperatura a 48°C
3	pH a 5.55
4	pH a 5.60

Se preparó una solución de referencia de ambos principios activos y se determinaron los parámetros cromatográficos, además se verificó que la cuantificación de los principios activos no variaran con cada una de las modificaciones.

La validación del método se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters constituido por: bomba modelo 510, inyector automático wisp modelo 712, detector UV de longitud de onda variable modelo 484, integrador(registrador) modelo 745.

La especificidad se realizó empleando un detector Waters 990 de arreglo de fotodiodos para cromatógrafo de líquidos, acoplado a una impresora printer plotter Waters modelo 5200.

7.RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

7.1. PARA CITRATO DE OXELADINA:

TABLA 1. Resultados obtenidos al cuantificar citrato de oxeladina para, determinar la linealidad, exactitud repetibilidad del método en el intervalo de trabajo.

NIVEL(%)	CONCENTRACION) ADICIONADA (µg/mL)	CONCENTRACION CUANTIFICADA (µg/mL)	PORCENTAJE CUANTIFICADO
80	76.80	76.93	100.17
		77.30	100.65
		77.46	100.85
90	86.40	87.14	100.86
		87.37	101.12
		87.19	100.91
100	96.00	98.11	102.20
		96.53	100.55
		97.22	101.27
110	106.60	106.00	100.38
		105.71	100.10
		105.48	99.89
120	115.20	115.90	100.61
		114.20	99.13
		115.51	100.38

La tabla 1. Muestra los resultados obtenidos al cuantificar citrato de oxeladina de los placebos adicionados, realizando recobros a diferentes concentraciones de la cantidad etiquetada. Posteriormente se muestra la evaluación estadística para dichos resultados al determinar los parámetros antes citados.

7.1.1. EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO:

Evaluando la relación entre la variable independiente (concentración adicionada) y la variable dependiente (concentración recuperada), utilizando los valores de la tabla 1.

FUNCION LINEAL: $y = mx + b$

DONDE: **b = Ordenada al origen**

m = Pendiente

x = Concentración adicionada (µg/ml)

y = Concentración cuantificada (µg/ml)

$$n = 15$$

$$\bar{x} = 96.00$$

$$\bar{y} = 96.54$$

7.1.1.1. COEFICIENTE DE CORRELACION Y COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r = 0.998921$$

$$r^2 = 0.997844$$

Al ser r^2 mayor a 0.98 significa que más del 98 % de la variabilidad total obtenida es explicada por la recta ajustada por lo que la relación entre la concentración adicionada y la concentración cuantificada es explicada adecuadamente por la función de la línea recta propuesta.

7.1.1.2. EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN

Inferencia de la ordenada al origen, a través de una prueba t de student al 95% de confianza, y n-2 grados de libertad.

$$\text{Ordenada al origen} = 2.0264$$

$$\text{Hipótesis de contraste: } H_0: a = 0$$

$$H_a: a \neq 0$$

$$t_{\text{exp.}} = 1.646$$

$$t_{0.95, 13 \text{ gl}} = 1.771$$

Debido a que la " $t_{\text{exp.}}$ " es menor t 0.95% nos indica que la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero.

Intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen.

$$\text{Limite superior} = 4.6850$$

$$\text{Limite inferior} = -0.6323$$

7.1.1.3. EVALUACION DE LA PENDIENTE.

Inferencia de la pendiente, a través de una prueba t de student al 95% de confianza, y n-2 grados de libertad.

$$\text{Pendiente} = 0.984549$$

$$\text{Prueba de hipótesis: } H_0: b = 1$$

$$H_a: b \neq 1$$

$$t_{\text{exp.}} = -1.218$$

$$t_{0.95, 13 \text{ gl}} = 1.771$$

Debido a que " $t_{\text{exp.}}$ " es menor $t_{0.95\%}$ nos indica que la pendiente no es estadísticamente diferente de uno.

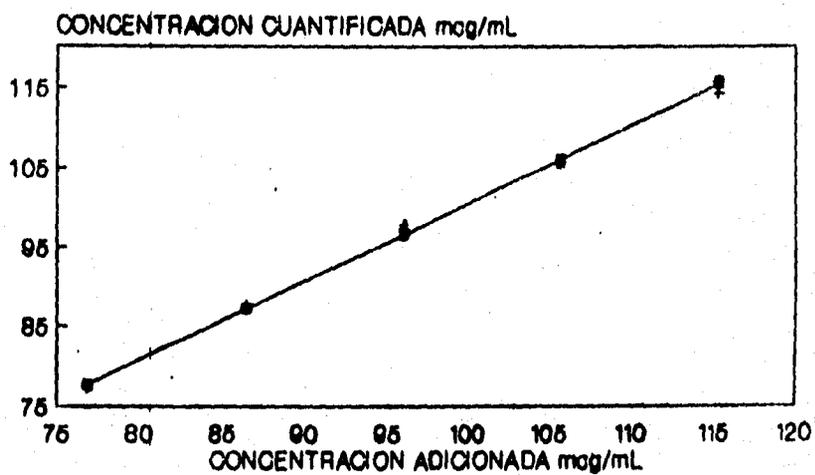
Intervalo de confianza al 95% para la pendiente

$$\text{Limite superior} = 1.0120$$

$$\text{Limite inferior} = 0.9571$$

Debido a que en los intervalos de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente se incluyen el 0 y el 1 respectivamente, se demuestra que no existe un sesgo de error proporcional.

LINEALIDAD DEL METODO CITRATO DE OXELADINA



Replica 1 + Replica 2 * Replica 3 —■— AJUSTADA

$$y = 2.0264 + 0.984540 x$$

Gráfica de la relación de la concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$) contra concentración cuantificada ($\mu\text{g/mL}$) de citrato de oxeladina de los datos presentes en la tabla 1.

7.1.2. EXACTITUD DEL METODO.

7.1.2.1. EXACTITUD DEL METODO EN EL INTERVALO ESTUDIADO.

Evaluación de la exactitud del método en el intervalo estudiado, utilizando los valores de porcentaje recuperado de la tabla 1.

$$\begin{array}{ll} n = 15 & s = 0.6926 \\ x = 100.60 & cv = 0.69 \% \end{array}$$

Inferencia de la media aritmética, a través de una prueba t de student al 95% de confianza y n-1 grado de libertad.

$$\begin{array}{ll} \text{Prueba de hipótesis: } H_0: = 100 \% & \\ & H_a: \neq 100 \% \\ t_{exp.} = 3.380 & t_{0.95, 14 gl} = 2.145 \end{array}$$

Intervalo de confianza :

Limite superior del intervalo de confianza = 100.99

Limite inferior del intervalo de confianza = 100.22

Como se observa, la "t exp." es mayor que la t 0.95 % 14 gl, con lo cual se concluye que la media es estadísticamente diferente del 100 % sin embargo la media se encuentra en el intervalo de 98 al 102 % y el intervalo de confianza al 95 % nos indica que la inexactitud del método va de 100.22 a 100.99, lo cual se considera como una adecuada exactitud para los fines de cuantificación.

7.1.2.2. EXACTITUD AL 100 %

TABLA 2. Resultados obtenidos al cuantificar citrato de oxeladina para determinar la exactitud al 100 %

NIVEL (%)	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)	PORCENTAJE CUANTIFICADO %
100	96.00	100.42
		99.53
		100.96
		99.90
		101.90
		100.57

La tabla 2. Muestra los resultados obtenidos al cuantificar citrato de oxeladina, de los placebos adicionados, para determinar la exactitud al 100 %.

$$n = 6 \quad s = 0.8216$$

$$x = 100.56 \quad cv = 0.82 \%$$

Inferencia de la media aritmética, a través de una prueba t de student al 95 % de confianza y n-1 gl.

Prueba de hipótesis: $H_0 = 100$
 $H_a \neq 100$

$$t_{\text{exp.}} = 1.669 \quad t_{0.95, 5 \text{ gl}} = 2.571$$

Intervalo de confianza:

Límite superior del intervalo de confianza = 101.4223

Límite inferior de intervalo de confianza = 99.70

Debido a que "t exp." es menor t 95 % y que el 100 % está incluido dentro del intervalo de confianza decimos que el método es exacto al 100 %.

7.1.3. PRECISION DEL METODO

7.1.3.1. REPETIBILIDAD.

Con los resultados obtenidos de porcentaje recuperado en los cuales se evaluó la exactitud al 100 % y en el intervalo de trabajo, se determinó la repetibilidad calculándose como coeficiente de variación (CV%).

CV% para exactitud al 100% = 0.82%

CV% para exactitud en el intervalo de trabajo = 0.69%

Como en ambos casos el CV% es menor al 2%, se concluye que el método es repetible.

7.1.3.2. REPRODUCIBILIDAD.

TABLA 3. Resultados obtenidos al cuantificar citrato de oxeladina, para determinar la reproducibilidad del método analítico.

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	107.92	108.33
		111.00	108.33
		108.08	107.08
	2	108.67	109.17
		108.83	108.50
		109.08	109.00

n=12 s=0.9499
x=108.74 cv=0.87%

La tabla 3. Muestra los resultados obtenidos al realizar recobros de la cantidad de citrato de oxeladina etiqueda, bajo diferentes condiciones de trabajo, es decir, en dos días diferentes y con dos analistas diferentes.

De acuerdo a que el coeficiente de variación global para los 2 analistas, el cual es menor al 2% se considera que el método es reproducible por cualquier analista en cualquier día.

7.1.4. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

TABLA 4. Resultados obtenidos al cuantificar citrato de oxeladina, para determinar la especificidad del método.

MUESTRA	AGENTE DEGRADANTE	PORCIENTO DE DEGRADACION DE CITRATO DE OXELADINA LONGITUD DE ONDA (nm)		DIFERENCIA MAXIMA DE PORCENTAJE
		220	210	
F	Hidróxido de Sodio	14.57	13.33	1.24
		11.61	10.71	0.90
	Acido Clorhídrico	15.37	11.59	3.78
		14.25	11.83	2.42
	Peróxido de Hidrógeno	NO SE OBTUVO DEGRADACION	
MP	Hidróxido de Sodio	19.58	19.58	0.00
		15.83	15.72	0.11
	Acido Clorhídrico	4.77	4.78	0.01
		4.77	2.90	1.87
	Peróxido de Hidrógeno	7.26	7.13	0.12
P	Hidróxido de Sodio	NO SE OBSERVO RESPUESTA	
	Acido Clorhídrico	NO SE OBSERVO RESPUESTA	
		NO SE OBSERVO RESPUESTA	
	Peróxido de Hidrógeno	NO SE OBSERVO RESPUESTA	

La tabla 4. Muestra los resultados obtenidos de porcentaje de degradación de citrato de oxeladina en las muestras de formulación (F), materia prima (MP) y placebo (P) sometidas a diferentes condiciones de degradación.

Como se observa en la tabla 4, las diferencias entre el porcentaje de degradación observado a las diferentes longitudes, son menores a 2 a excepción de la formulación degradada con ácido clorhídrico donde es de 3.78 diferencia adjudicable a las condiciones extremas de degradación y a la poca degradación. Los resultados obtenidos indican que existe una alta probabilidad de que la cuantificación del principio activo sea selectivo.

No se extremaron las condiciones para obtener degradación con peróxido de hidrógeno para el caso de la formulación, ni para incrementar la degradación de materia con ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno, puesto que estas en sí resultan drásticas.

Con el objeto de demostrar la pureza del pico cromatográfico eluido, correspondiente a citrato de oxeladina se realizó un análisis espectral que consiste en: Análisis de contorno, sobreposición espectral y comparación contra el espectro de la sustancia de referencia.

Como ejemplo se muestra la degradación de citrato de oxeladina materia prima sometida a degradación con peróxido de hidrógeno.

A continuación se presenta el análisis espectral de la muestra sometida a degradación. El cual consiste en un cromatograma a longitud de onda de trabajo (220 nm), un contorno espectral, donde en el eje de las "x" se presenta el tiempo de elución, en el eje de las "z" el intervalo de longitudes de onda de 200 a 300 nm y la absorbancia en el eje de las "y". Presenta además, la selección de los diferentes tiempos de elución del pico de interés. Figura 16.

En la figura 17 y 18. Respectivamente se muestra la sobreposición espectral de los tiempos de elución seleccionados y la comparación del espectro de citrato de oxeladina sustancia de referencia, contra el de la muestra degradada.

PUREZA CROMATOGRÁFICA:

- ANÁLISIS DE CONTORNO ESPECTRAL.

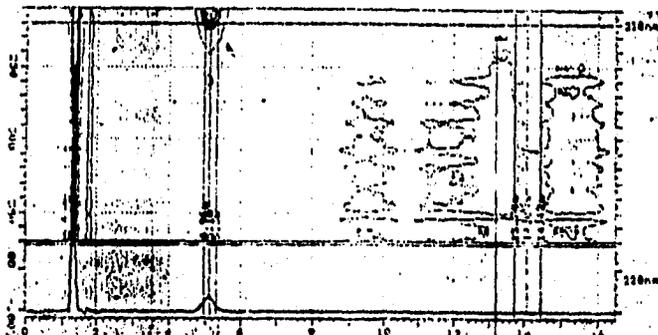


Figura 16. Análisis de contorno espectral de citrato de oxeladina materia prima, sometida a degradación con peróxido de hidrógeno.

- SOBREPOSICIÓN ESPECTRAL.

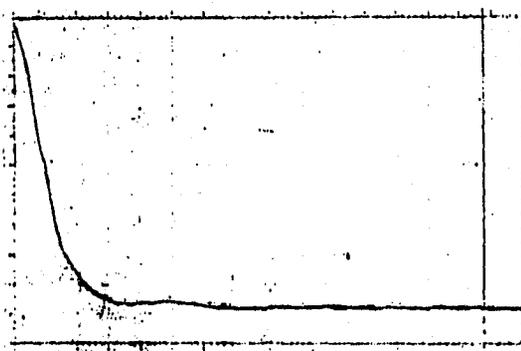


Figura 17. Sobreposición de los espectros de citrato de oxeladina materia prima, correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma anterior.

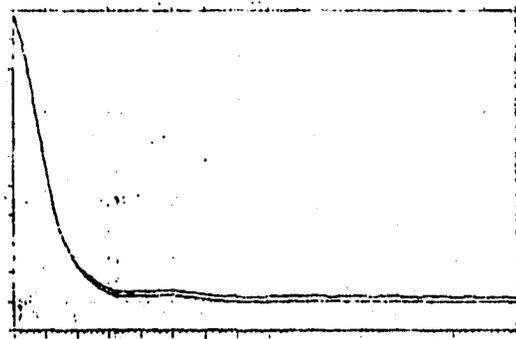
- COMPARACION DE ESPECTROS.

Figura 18. Comparación de espectros de citrato de oxeladina sustancia patrón de referencia y citrato de oxeladina materia prima sometida a degradación con peróxido de hidrógeno.

Como se observa no hay señales atribuibles a la presencia de otros compuestos en los mismos tiempos de elución que los de la señal de interés. Existe una identidad espectral muy alta entre citrato de oxeladina materia prima sometida a degradación con peróxido de hidrógeno y el citrato de oxeladina sustancia de referencia, lo que constituye evidencia suficiente para decir que en la respuesta no hay interferencia ocasionada por algún producto de degradación, y la impureza y que el pico obtenido corresponde a citrato de oxeladina. Además la cuantificación de citrato de oxeladina a las distintas longitudes de onda estudiadas fueron similares, por lo que se dice que este método es específico para la cuantificación de citrato de oxeladina en jarabe.

De igual manera se procedió con todas las muestras degradadas obteniéndose resultados similares en todas las muestras.

7.1.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

TABLA 5. Resultados obtenidos al cuantificar citrato de oxeladina para determinar la estabilidad.

A) Inicial (CONTROL)			
Muestra 1	108.67		
Muestra 2	108.83		
Muestra 3	109.08		
Promedio	108.86 %		

B) 12 horas			
	AMBIENTE	OSCURIDAD	REFRIGERACION
Muestra 1	109.00	107.33	108.33
Muestra 2	108.33	107.25	107.58
Muestra 3	107.56	106.75	107.17
Promedio	108.30 %	107.11 %	107.69 %

La tabla 5. Muestra los resultados obtenidos de las muestras almacenadas durante 12 horas a diferentes condiciones de temperatura ambiente y refrigeración.

TABLA 6. Promedio de los porcentajes cuantificados de citrato de oxeladina a las diferentes condiciones de almacenamiento (*), y porcentaje de las diferencias con respecto al control (**)

TIEMPO	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO		
	AMBIENTE	OSCURIDAD	REFRIGERACION
	99.00 % (*)	96.83 %	97.56 %
12 horas	0.94 % (**)	3.11 %	2.38 %

Al cuantificar las muestras a las condiciones de almacenamiento propuestas, se obtiene una diferencia menor al 2 % respecto a la cuantificación original se considera que el citrato de oxeladina en la muestra es estable en condiciones ambiente, oscuridad y refrigeración hasta 12 horas.

7.1.6. TOLERANCIA DEL SISTEMA.

TABLA 7. Promedio de los parámetros cromatográficos del sistema realizando diferentes modificaciones.

MODIFICACION No.	COMPUESTO	PLATOS TEORICOS	RETENCION RELATIVA	FACTOR DE CAPACIDAD	FACTOR DE COLEO	RESOLUCION
—	** OXELADINA	1,971.55	1.00	3.31	0.99	6.71
—	BELOMETASONA	2,374.05	2.04	6.75	0.92	—
1	OXELADINA	1,822.02	1.00	3.63	1.08	6.12
	BELOMETASONA	1,755.94	2.05	7.45	0.97	—
2	OXELADINA	1,634.17	1.00	3.27	1.06	5.88
	BELOMETASONA	1,672.26	2.06	6.75	0.97	—
3	OXELADINA	1,660.10	1.00	3.41	1.08	6.03
	BELOMETASONA	1,771.96	2.06	7.03	0.97	—
4	OXELADINA	1,720.56	1.00	3.43	1.02	6.03
	BELOMETASONA	1,746.71	2.06	7.08	0.96	—

** Oxeladina = Citrato de Oxeladina (compuesto de interes)

Beclometasona = Dipropionato de beclometasona (estandar interno)

TABLA 8. Resultados de porcentaje cuantificado de citrato de oxeladina y sus diferencias con respecto a las condiciones normales.

MODIFICACION No	%CUANTIFICADO	DIFERENCIA
---	112.14	---
1	110.59	-1.55
2	111.17	-0.97
3	111.00	-1.14
4	110.08	-1.06

Debido a que las diferencias de los porcentajes cuantificados de citrato de oxeladina son menores al 2 %, se considera que estas modificaciones al sistema cromatográfico son tolerables y que el sistema es adecuado cuando los valores de los parámetros cromatográficos se encuentran entre los valores reportados en la tabla 7.

7.2. PARA CLORHIDRATO DE BROMHEXINA.

TABLA I. Resultados obtenidos al cuantificar clorhidrato de bromhexina para, determinar la linealidad, exactitud y repetibilidad del método en el intervalo de trabajo.

NIVEL(%)	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CONCENTRACION CUANTIFICADA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	PORCENTAJE CUANTIFICADO
80	38.40	39.00	101.56
		38.51	100.29
		38.86	101.20
90	43.20	43.28	100.18
		43.33	100.30
		44.17	102.25
100	48.00	48.01	100.02
		47.85	99.69
		47.78	99.50
110	52.80	53.51	101.34
		53.28	100.87
		53.00	100.38
120	57.60	58.07	100.82
		57.78	100.33
		57.70	100.17

La tabla I. Muestra los resultados obtenidos al cuantificar clorhidrato de bromhexina de los placebos adicionados, realizando recobros a diferentes concentraciones de la cantidad etiquetada.

Posteriormente se llevó a cabo la evaluación estadística para dichos resultados al determinar los parámetros antes citados.

7.2.1. EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO:

Evaluando la relación entre la variable independiente (concentración adicionada) y la variable dependiente (concentración recuperada), utilizando los valores de la tabla I.

FUNCION LINEAL: $Y = mx + b$

DONDE: b = Ordenada al origen

m = Pendiente

x = Concentración adicionada ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

y = Concentración cuantificada ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

$$n = 15$$

$$x = 48.00$$

$$y = 48.27$$

7.2.1.1. COEFICIENTE DE CORRELACION Y COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r = 0.995625$$

$$r^2 = 0.997791$$

Al ser r^2 mayor a 0.98 significa que más del 98 % de la variabilidad total obtenida es explicada por la recta ajustada por lo que la relación entre la concentración adicionada y la concentración cuantificada es explicada adecuadamente por la función de la línea recta propuesta.

7.2.1.2. EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN.

Inferencia de la ordenada al origen a través de una prueba t de student al 95% de confianza, y n-2 grados de libertad.

$$\text{Ordenada al origen} = 0.4833$$

$$\text{Hipótesis de contraste: } H_0: a = 0$$

$$H_a: a \neq 0$$

$$t_{\text{exp.}} = 0.768$$

$$t_{0.95, 13 \text{ gl}} = 1.771$$

Debido a que la "t exp." es menor t 0.95% nos indica que la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero.

Intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen.

$$\text{Limite superior} = 1.8444$$

$$\text{Limite inferior} = -0.8771$$

7.2.1.3. EVALUACION DE LA PENDIENTE.

Inferencia de la pendiente a través de una prueba t de student al 95% de confianza, y n-2 grados de libertad.

$$\text{Pendiente} = 0.995625$$

Prueba de hipótesis: $H_0: b = 1$

$H_a: b \neq 1$

$$t_{\text{exp}} = -0.337$$

$$t_{0.95, 13 \text{ gl}} = 1.771$$

Debido a que " t_{exp} " es menor $t_{0.95\%}$ nos indica que la pendiente no es estadísticamente diferente de uno.

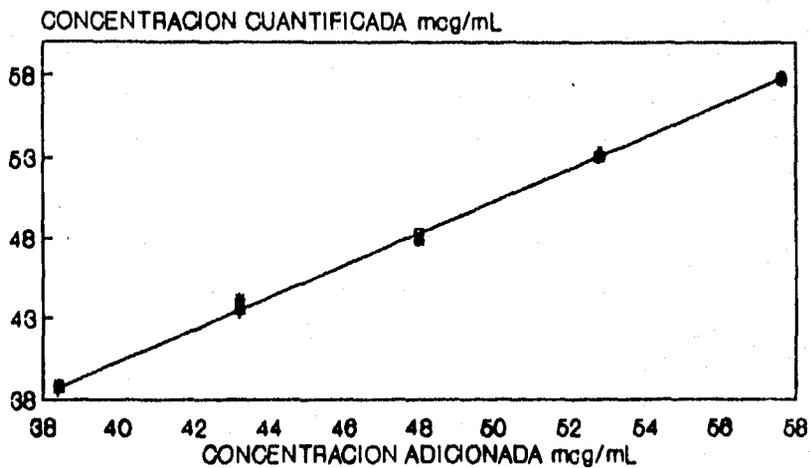
Intervalo de confianza al 95% para la pendiente:

$$\text{Limite superior} = 1.0237$$

$$\text{Limite inferior} = 0.9675$$

Debido a que en los intervalos de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente se incluyen el 0 y el 1 respectivamente, se demuestra que no existe un sesgo de error proporcional.

LINEALIDAD DEL METODO CLORHIDRATO DE BROMHEXINA



• Replica 1 + Replica 2 * Replica 3 —■— AJUSTADA

$$y = 0.4836 + 0.995617 x$$

Gráfica de la relación de la concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$) contra concentración cuantificada ($\mu\text{g/mL}$) de clorhidrato de bromhexina de los datos presentes en la tabla 1.

7.2.2. EXACTITUD DEL METODO.

7.2.2.1. EXACTITUD DEL METODO EN EL INTERVALO ESTUDIADO.

Evaluación de la exactitud del método en el intervalo estudiado, utilizando los valores de porcentaje recuperado de la tabla I.

$$\begin{aligned}n &= 15 & s &= 0.7420 \\x &= 100.59 & cv &= 0.74 \%\end{aligned}$$

Inferencia acerca de la media aritmética a través de una prueba t de student al 95% de confianza y n-1 grado de libertad.

$$\begin{aligned}\text{Prueba de hipótesis:} & & H_0: &= 100 \% \\ & & H_a: &\neq 100 \% \\ t_{\text{exp.}} &= 3.092 & t_{0.95, 14 \text{ gl}} &= 2.145\end{aligned}$$

Intervalo de confianza :

Limite superior del intervalo de confianza = 101.00

Limite inferior del intervalo de confianza = 100.18

Como se observa, la "t exp." es mayor que la t 0.95 % 14 gl, con lo cual se concluye que la media es estadísticamente diferente del 100 % sin embargo la media se encuentra en el intervalo de 98 al 102 % y el intervalo de confianza al 95 % nos indica que la inexactitud del método va del 100.18 a 101.00, lo cual se considera como una adecuada exactitud para los fines de cuantificación.

7.2.2.2. EXACTITUD AL 100 %.

TABLA 2. Resultados obtenidos al cuantificar clorhidrato de bromhexina para determinar la exactitud al 100 %.

NIVEL(%)	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	PORCENTAJE CUANTIFICADO %
100	48.00	100.42
		99.63
		101.58
		99.90
		98.31
		101.02

La tabla 2. Muestra los resultados obtenidos al cuantificar clorhidrato de bromhexina, de los placebos adicionados, para determinar la exactitud al 100 %.

$$n = 6 \quad s = 1.148368$$

$$\bar{x} = 100.14 \quad cv = 1.15 \%$$

Inferencia acerca de la media aritmética a través de una prueba t de student al 95 % de confianza y n-1 gl.

Prueba de hipótesis $H_0 = 100$

$H_a \neq 100$

$t_{exp.} = 0.306$

$t_{0.95, 5 \text{ gl}} = 2.571$

Intervalo de confianza:

Límite superior del intervalo de confianza = 101.35

Límite inferior de intervalo de confianza = 98.94

Debido a que " $t_{exp.}$ " es menor $t_{95\%}$ y que el 100 % está incluido dentro del intervalo de confianza decimos que el método es exacto al 100 %.

7.2.3. PRECISION DEL METODO

7.2.3.1. REPETIBILIDAD.

Con los resultados obtenidos de porcentaje recuperado en los cuales se evaluó la exactitud al 100 % y en el intervalo de trabajo, se determinó la repetibilidad calculandose como coeficiente de variación (CV%).

$$\text{CV\% para exactitud al 100\%} = 1.15\%$$

$$\text{CV\% para exactitud en el intervalo de trabajo} = 0.74\%$$

Como en ambos casos el CV% es menor al 2%, se concluye que el método es repetible.

7.2.3.2. REPRODUCIBILIDAD.

TABLA 3. Resultados obtenidos al cuantificar clorhidrato de bromhexina, para determinar la reproducibilidad del método analítico.

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	99.17	99.80
		99.17	99.17
		98.83	98.33
	2	99.83	100.33
		100.00	99.83
		100.00	100.00

$$n=12 \quad s=0.5877$$

$$x=99.51 \quad cv=0.59\%$$

La tabla 3. Muestra los resultados obtenidos al realizar recobros de la cantidad de clorhidrato de bromhexina etiquetada, bajo diferentes condiciones de trabajo, es decir, en dos días diferentes y con dos a analistas diferentes.

De acuerdo a que el coeficiente de variación global para los 2 analistas, el cual es menor al 2% se considera que el método es reproducible por cualquier analista en cualquier día.

7.2.4. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

TABLA 4. Resultados obtenidos al cuantificar clorhidrato de bromhexina, para determinar la especificidad del método.

MUESTRA	AGENTE DEGRADANTE	PORCIENTO DE DEGRADACION DE CLORHIDRATO DE BROMHEXINA LONGITUD DE ONDA (nm)			DIFERENCIA MAXIMA DE PORCENTAJE
		220	230	249	
F	Hidróxido de Sodio	NO SE OBTUVO DEGRADACION			---
	Acido Clorhídrico	4.07	6.75	5.40	3.02
	Peróxido de Hidrógeno	4.88	5.11	5.73	0.85
		4.55	3.13	3.76	1.86
MP	Hidróxido de Sodio	18.77	17.67	18.17	1.10
	Acido Clorhídrico	18.40	16.67	16.73	1.73
		11.33	11.17	11.27	0.80
	Peróxido de Hidrógeno	9.90	9.17	9.83	1.00
P	Hidróxido de Sodio	6.83	5.17	5.47	1.66
	Acido Clorhídrico	5.20	4.17	4.37	1.03
		NO SE OBSERVO RESPUESTA			---
	Peróxido de Hidrógeno	NO SE OBSERVO RESPUESTA			---

La tabla 4. Muestra los resultados obtenidos de porcentaje de degradación de clorhidrato de bromhexina en las muestras sometidas a diferentes condiciones de degradación.

Como se observa en la tabla 4, las diferencias entre el porcentaje de degradación observado a las diferentes longitudes, son menores a 2 a excepción de la formulación degradada con ácido clorhídrico donde es de 3.02 diferencia adjudicable a las condiciones extremas de degradación y a la poca degradación. Los resultados obtenidos indican que existe una alta probabilidad de que la cuantificación del principio activo sea selectivo.

No se extremaron las condiciones para obtener degradación con hidróxido de sodio en la formulación, tampoco para obtener mayor degradación con ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno en formulación y materia prima puesto que estas en si resultan drásticas.

Con el objeto de demostrar la pureza del pico cromatográfico eluido, correspondiente a clorhidrato de bromhexina se realizó un análisis espectral que consiste en: Análisis de contorno, sobreposición espectral y comparación contra el espectro de la sustancia de referencia.

Como ejemplo se muestra la degradación de clorhidrato de bromhexina materia prima sometida a degradación con hidróxido de sodio.

A continuación se presenta el análisis espectral de la muestra sometida a degradación. El cual consiste en un cromatograma a longitud de onda de trabajo (220 nm), un contorno espectral, donde en el eje de las "x" se presenta el tiempo de elución, en el eje de las "z" el intervalo de longitudes de onda de 200 a 300 nm y la absorbancia en el eje de las "y". Presenta además, la selección de los diferentes tiempos de elución del pico de interes. Figura 19.

En la figura 20 y 21 Respectivamente se muestra la sobreposición espectral de los tiempos de elución seleccionados y la comparación del espectro de clorhidrato de bromhexina sustancia de referencia, contra el de la muestra degradada.

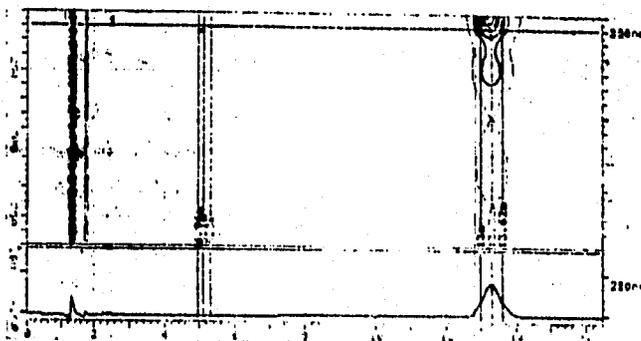
PUREZA CROMATOGRÁFICA:**- ANÁLISIS DE CONTORNO ESPECTRAL.**

Figura 19. Análisis de contorno espectral de clorhidrato de bromhexina materia prima, sometida a degradación con hidróxido de sodio.

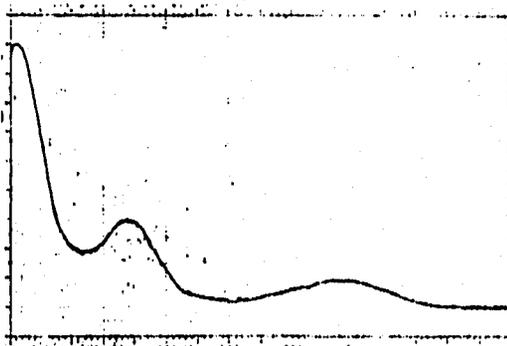
- SOBREPOSICIÓN ESPECTRAL.

Figura 20. Sobreposición de los espectros de clorhidrato de bromhexina materia prima, correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma anterior.

- COMPARACION DE ESPECTROS.

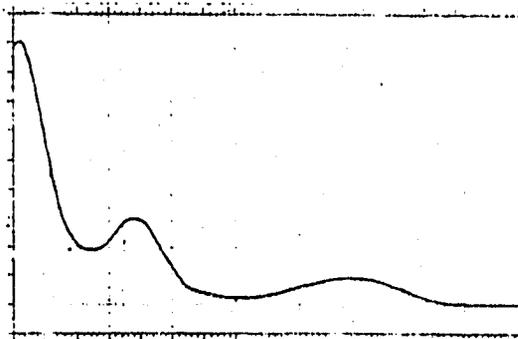


Figura 21. Comparación de espectros de clorhidrato de bromhexina sustancia de referencia y clorhidrato de bromhexina materia prima sometida a degradación con hidróxido de sodio.

Como se observa no hay señales atribuibles a la presencia de otros compuestos en los mismos tiempos de elución que los de la señal de interés. Existe una alta identidad espectral entre clorhidrato de bromhexina materia prima sometida a degradación con hidróxido de sodio y el clorhidrato de bromhexina sustancia de referencia, lo que constituye evidencia suficiente para decir que en la respuesta no hay interferencia ocasionada por algún producto de degradación y/o impureza y que el pico obtenido corresponde a clorhidrato de bromhexina. Además la cuantificación de clorhidrato de bromhexina a las distintas longitudes de onda estudiadas fueron similares, por lo que se dice que este método es específico para la cuantificación de clorhidrato de bromhexina en jarabe.

De igual manera se procedió con todas las muestras degradadas obteniéndose resultados similares en todas las muestras.

7.2.5 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

TABLA 5. Resultados obtenidos al cuantificar clorhidrato de bromhexina para determinar la estabilidad.

A) Inicial (CONTROL)			
Muestra 1	99.83		
Muestra 2	100.00		
Muestra 3	100.00		
Promedio	99.94 %		

B) 12 horas			
	AMBIENTE	OSCURIDAD	REFRIGERACION
Muestra 1	98.67	97.17	98.17
Muestra 2	98.67	96.83	97.50
Muestra 3	98.67	96.50	97.00
Promedio	99.00 %	96.83 %	97.56 %

La tabla 5. Muestra los resultados obtenidos de las muestras almacenadas durante 12 horas a diferentes condiciones de temperatura ambiente y refrigeración.

TABLA 6. Promedio de los porcentajes cuantificados de clorhidrato de bromhexina a las diferentes condiciones de almacenamiento (*), y porcentaje de las diferencias con respecto al control (**)

TIEMPO	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO		
	AMBIENTE	OSCURIDAD	REFRIGERACION
12 horas	99.00 % (*)	96.83 %	97.56 %
	0.94 % (**)	3.11 %	2.38 %

Al cuantificar las muestras a las condiciones de almacenamiento propuestas, solamente, a condiciones ambiente, se obtiene una diferencia menor al 2 % respecto a la cuantificación original, se considera que el clorhidrato de bromhexina en la muestra, es estable hasta 12 horas condiciones ambiente.

7.2.6. TOLERANCIA DEL SISTEMA.

TABLA 7. Promedio de los parámetros cromatográficos del sistema realizando diferentes modificaciones.

MODIFICACION No.	COMPUESTO	PLATOS TEORICOS	RETENCION RELATIVA	FACTOR DE CAPACIDAD	FACTOR DE COLEO	RESOLUCION
—	**BROMHEXINA	4,568.88	3.20	10.57	0.86	5.78
—	BECLOMETASONA	2,374.06	2.04	6.75	0.92	—
1	OXELADINA	3,857.10	3.20	11.63	1.01	5.16
	BECLOMETASONA	1,756.94	2.05	7.45	0.97	—
2	OXELADINA	3,443.86	3.26	10.68	1.00	5.04
	BECLOMETASONA	1,672.26	2.06	6.75	0.97	—
3	OXELADINA	3,752.16	2.98	10.15	0.93	4.18
	BECLOMETASONA	1,771.96	2.06	7.03	0.97	—
4	OXELADINA	3,800.55	3.35	11.52	0.99	5.60
	BECLOMETASONA	1,746.71	2.06	7.07	0.96	—

** BROMHEXINA = Clorhidrato de bromhexina (compuesto de interés)

BECLOMETASONA = Dipropionato de Beclometasona (estandar interno)

* La retención relativa se obtuvo en relación al citrato de oxeladina, el cual se le adjudico el valor de 1.

TABLA 8. Resultados de porcentaje cuantificado de clorhidrato de bromhexina y sus diferencias con respecto a las condiciones normales.

MODIFICACION No	%CUANTIFICADO	DIFERENCIA
---	101.83	---
1	103.00	1.17
2	102.11	0.28
3	102.17	0.34
4	100.94	-0.89

Debido a que las diferencias de los porcentajes cuantificados de clorhidrato de bromhexina son menores al 2 %, se considera que estas modificaciones al sistema cromatográfico son tolerables y que el sistema es adecuado cuando los valores de los parámetros cromatográficos se encuentran entre los valores reportados en la tabla 7.

8. CONCLUSIONES

- Los resultados que se obtuvieron en cuanto al desarrollo del método condujeron a un método analítico práctico. Así tenemos un método sencillo y rápido capaz de lograr combinar la cuantificación de ambos principios activos en una misma corrida cromatográfica.

- En cuanto a la validación el método cumple satisfactoriamente con los parámetros estudiados:

- El método es lineal para citrato de oxeladina en el intervalo de concentraciones de 76.8 a 115.2 $\mu\text{g/ml}$. Para clorhidrato de bromhexina de 38.40 a 57.60 $\mu\text{g/ml}$.

- Debido a que en los intervalos de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente se incluye el 0 y 1 respectivamente se demuestra que no hay error proporcional consistente y constante. Esto para ambos principios activos.

- La exactitud del método es 100.60 % con un intervalo de confianza al 95 % entre 100.99 y 100.22 en todo el intervalo estudiado y de 100.56 con un intervalo de confianza al 95 % entre 101.42 y 99.70 al 100 %, para citrato de oxeladina.

- Para clorhidrato de bromhexina la exactitud del método es 100.59 % con un intervalo de confianza al 95 % entre 101.00 y 100.28 en todo el intervalo estudiado y de 100.14 con un intervalo de confianza al 95 % entre 101.35 y 98.94 al 100 %.

- El método es selectivo para cuantificar citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina en presencia de los demás componentes de la formulación y sus posibles productos de degradación y es adecuado para realizar estudios de estabilidad.

- El método es repetible y reproducible para ambos principios activos.

- Las muestras ya procesadas listas para su análisis son estables a temperatura ambiente hasta 12 horas después de preparadas. Para ambos principios activos.

El sistema es tolerante a las variaciones de pH de la fase móvil entre 5.55 y 5.65 y a variaciones en la temperatura de la columna entre 47° y 48°C.

- El método analítico para la cuantificación de citrato de oxeladina y clorhidrato de bromhexina respectivamente, es adecuado para ser aplicado al producto en proceso y terminado, así como para realizar estudios de estabilidad en jarabe.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO A

FORMULAS PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DEL METODO:

- EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN

Prueba de hipotesis Ho: $a = 0$
Ha: $a \neq 0$

Estadígrafo de contraste :

$$t \text{ cal.} = \frac{a - 0}{\hat{s}y/x \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

Decision estadística :

si $t \text{ cal.} \leq t (0.975, n - 2 \text{ gl})$
y $t \text{ cal.} \geq t (0.025, n - 2 \text{ gl})$

Puede considerarse que estadísticamente $a = 0$

Intervalo de confianza al 95 % :

$$a \pm t_{1-\alpha/2} \hat{s}y/x \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

- EVALUACION DE LA PENDIENTE :

Prueba de hipotesis Ho: $b = 1$
Ha: $b \neq 1$

Estadígrafo de contraste :

$$t \text{ cal.} = \frac{(b - 1) (s_y/x) \sqrt{n-1}}{\hat{s}y/x}$$

Decision estadística :

si $t \text{ cal.} \leq t (0.975, n - 2 \text{ gl})$
y $t \text{ cal.} \geq t (0.025, n - 2 \text{ gl})$

Puede considerarse que estadísticamente $b = 1$

Intervalo de confianza al 95 % :

$$b \pm t_{1-\alpha/2} \frac{\hat{s}_{y/x}}{s_x \sqrt{n-1}}$$

Si ambas hipótesis, tanto para a como para b son aceptadas, el método se considera como lineal.

ANEXO B

FORMULAS PARA EVALUAR LA EXACTITUD DEL METODO:

Media: $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

Desviación Estandar :

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

Coefficiente de variación:

$$\text{c.v.} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Prueba de hipótesis H_0 : = 100 %

H_a : \neq 100 %

Estadístico de contraste :

$$t_{\text{cal.}} = \frac{\bar{x} - 100\%}{s/\sqrt{n}}$$

Decisión estadística :

si $t_{\text{cal.}} < t(0.975, n-1)$
y $t_{\text{cal.}} > t(0.025, n-1)$

El método se considera exacto

Intervalo de confianza al 95 % :

$$\bar{x} \pm t_{\alpha/2} (s/\sqrt{n})$$

ANEXO C

FORMULAS PARA EVALUAR LA PRECISION DEL METODO ANALITICO:

Media: $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

Desviación Estandar :

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

Coficiente de variación:

$$c.v. = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

9. BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Halstead, W.; "Determination of amine Ingredients in Cough-Cold Liquids by Reversed Phase Ion-Air High-Performance Liquid Chromatography"; *J. Pharm. Sci.*; 71:10:1108-1111; (1982).
- 2.- Litter, M.; "Farmacologia Experimental y Clinica." 7a ed., Ed. Atenco; Argentina; 45-859; (1983).
- 3.- Kiro, Shimamoto. y Takashi, Honjo.; "Pharmacological effects of N-cyclohexyl-N- methyl(2-mino-3,5-dibromobenzyl)-ammonium chloride (Bisolvon); with special reference to its espectoran action"; *Acta Med. Univ. Kioto*; 10: 99-117; (1968).
- 4.- The Merck Index; 11th ed.; Merck and co.Inc. Rahway, NJ, USA; 1382, 6881; 1989).
- 5.- Clarke's Isolation and Identification of Drugs; 2th ed.; Ed.The Pharmaceutical Press; London; 401,837; (1986).
- 6.- Petrow, B., V., O., Stephenson, y A., M., Wild; "The diethy aminoethoxy ester of diethylphenylacetic acid.; A.new antitusive agent"; *J. Pharm.and Pharmacol*; 40:10: 40-47; (1958).
- 7.- Sandri, Cavicchi, G.; Cristofori, B.; Quaglio, M.P.; "Caratteri analitici di Farmaci antitussivi"; *Boll. Chim. Farm.*; 108:682-686; (1969).
- 8.- S.Casadio, F.Sossi.; "Sal dosaggio del citrato del estere dietilaminoetossietilico dell acido a,a,dietilfenilacetico salo e nelle preparazconi farmaceutiche"; *Farmaco II Ed. Pr. vol.XIII Fasc.7*; 371-379.
- 9.- Bjarne, Salvesen y Torlelf, Haugland.; "Determination of oxeladin in human serumen by gas-liquid chromatography with thermionic detection"; *Journal of Chromatography*; 225: 463-468; (1981).

- 10.- British Pharmacopeia; Vol. I; London; 64; (1980)
- 11.- British Pharmacopeia; Vol. I; London; 87-88; (1993).
- 12.- Martindale.; "The extra Pharmacopeia"; 28th ed.; Ed. The Pharmaceutical Press; London, 687; 1982)
- 13.- "The Pharmacopoeia of Japan"; 11th ed.; Japan; 358-360; (1987).
- 14.- Bowman y Rand.; "Farmacología Bases Químicas y Patológicas"; 2a ed.; Ed. Interamericana; México; 2410-2412; (1980).
- 15.- Lal, S. and Bhalla, K.K.; "A controlled trial of bromhexine (Bisolvon) in out-patients with bronchitis"; Curr. Med. Res.Opin.; 3:2; (1975).
- 16.- Hamilton, R. J. y Sewell, P. A.; "Introduction to high performance liquid chromatography"; J.Willey & Sons Inc.;USA; (1977).
- 17.- Snyder, L. R. y Kikland; "Practical HPLC methods development"; Ed. John Wily & Sons; USA; 16-50, 125-142; (1988).
- 18.- Yost, R. W., L. S. Etre y R. D. Colons, "Introducción a la cromatografía líquida práctica"; Perkin-Elmer; USA; 32- 105; (1980).
- 19.-Perone, P. A. PhD; "A laboratory manual for liquid chromatography" Perkin-Elmer; Corporation; USA; 89 p. (1986).
- 20.- Harol, M. Mc., Nair Benjamin Esquivel H.; "Cromatografía líquida de alta presión"; 2a ed.; Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos; Washinton DC; 2-11,40- 45; (1980).

- 21.- U.S. Pharmacopeia XXII; National Formulary XVII; 1558-1568, 1710-1712; (1990).
- 22.- Milton, T. W. Hearn; "Ion-Par Chromatography" New York; 31: 141-163; (1985).
- 23.- Guerra, J.; "Validación de Métodos Analíticos por la F.D.A."; Phram. Tech.; 10: 74-80; (1986).
- 24.- Jimenez, Vargas; "Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos"; Pharma News; 1:6; 15-20; (1990).
- 25.- Fontani, F.; "Validación de Métodos Analíticos"; Boll. Chim. Farm.; 126:2; 66-74; (1987).
- 26.- U.S. Pharmacopeia 23; National Formulary 18; 1983-1984; (1995).