



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**REDUCCIÓN DE COSTOS Y TIEMPOS DE ANÁLISIS
EN LA DETERMINACIÓN DE GUAIFENESINA,
DEXTROMETORFANO, METILPARABENO Y
PROPILPARABENO EN UN JARABE
EXPECTORANTE POR ULTRA PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A N:
MARÍA ELENA ZAMORA ZARAGOZA[†]
FERNANDO PEÑA FELIPE



DIRECTORA Q. F. B. Domitila Burgos Jara
ASESORA Q. F. B. Cirenía Sandoval López

MEXICO, D. F., 23 DE NOVIEMBRE DE 2009.



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.

**REDUCCIÓN DE COSTOS Y TIEMPOS DE ANÁLISIS
EN LA DETERMINACIÓN DE GUAIFENESINA,
DXTROMETORFANO, METILPARABENO Y
PROPILPARABENO EN UN JARABE
EXPECTORANTE POR ULTRA PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC)**

"La vida es solo un instante pasajero del alma, que en ocasiones no es suficiente para cumplir todos nuestros sueños y anhelos" donde tenemos un contacto con las cosas que nos hacen querer, sentir, vibrar, apasionarnos por nuestro trabajo, respetar cada uno de los seres que nos rodean, de nuestros compromisos y fracasos. Estos sentimientos que llegan a ocupar un lugar de especial importancia, hasta el día de nuestra partida.

Pensamientos que ella nos regaló y que seguramente le habría gustado compartiéramos en breves palabras con ustedes, mujer, excelente persona y madre. Disfruté y amo enormemente la profesión de químico farmacéutico, misma que ejerció por más de 15 años en diferentes áreas y puestos de empresas de la industria farmacéutica siempre con el reconocimiento de sus superiores.

Sin embargo decía mantener la deuda de no haberse titulado de inmediato, situación que se empeño con enormes esfuerzos y compromiso en cumplir pero que por azares del destino no le fue posible llevar a cabo con este proyecto.

Yo que escribo por ella agradezco en su nombre a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza el haberle brindado la oportunidad de hacer sus estudios de licenciatura que le permitieron adquirir los conocimientos suficientes para ejercer exitosamente en los diferentes lugares donde le toco laborar.

De antemano sus familiares compañeros y amigos damos las gracias a todo aquel que tome un poco de su tiempo en leer estas líneas.

A la memoria de Q.F.B. Elena Zamora Zaragoza 1968 – 2008.

AGRADECIMIENTOS FERNANDO

En primer lugar a Dios por haberme dado la bendición mas grande de todo ser humano regalándome a mis tres tesoros Hazel, Fernando Ángel y Daniel.

A mi esposa Angélica por haber llegado a mi vida y por apoyarme en todo momento.

A mi mamá Manuela y mi hermana Lucero por enseñarme a luchar ante la adversidad y demostrarme que no existe nada imposible

A mi abuelita Julianita y mi tío José por darme su apoyo en todo momento sin pedir nada a cambio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi alma Mater

A Lucero, Mónica y Luis

A las maestras Domitila, Lourdes, Cirenia Susana y Leticia por su valiosa orientación.

A Isabel por su gran apoyo y confianza.

A mis amigos Edgar, Miguel, Blanca, Ismael, Ana María, Gisela e Irvin por poder contar con ellos en todo momento.

*Solo le pido a Dios
Que el dolor no me sea indiferente
Que la reseca muerte no me encuentre
Vacío y solo sin haber echo lo suficiente*

*Solo le pido a Dios
Que lo injusto no me sea indiferente
Que no me abofeteen la otra mejilla
Después que una garra me arañe esta frente*

*Solo le pido a Dios
Que la guerra no me sea indiferente
Es un monstruo grande y pisa fuerte
Toda la pobre inocencia de la gente
Es un monstruo grande y pisa fuerte
Toda la pobre inocencia de la gente*

*Solo le pido a Dios
Que el engaño no me sea indiferente
Si un traidor puede más que unos cuantos
Que esos cuantos no lo olviden fácilmente*

*Solo le pido a Dios
Que el futuro no me sea indiferente
Desahuciado esta el que tiene que marchar
A vivir una cultura diferente*

Leon Gieco

	Página
Resumen.....	1
I. Introducción.....	3
II. Marco Teórico	4
A. Breve Historia de la Cromatografía.....	4
B. Definición de Cromatografía.....	7
C. Bases de la Separación.....	8
D. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	9
1. Parámetros en HPLC.....	10
2. La ecuación de van Deemter.....	14
3. Ultra Performance Liquid Chromatography	17
4. Equipos en Cromatografía de Líquidos.....	18
a) Características HPLC.....	18
b) Características UPLC.....	22
E. Validación de Métodos Analíticos.....	25
F. Principios Activos y Excipientes.....	28
1. Guaifenesina.....	28
2. Dextrometorfano.....	33
3. Metilparabeno.....	36
4. Propilparabeno.....	39
III. Problema Resuelto.....	42
IV. Objetivos.....	43
V. Diseño Experimental.....	44
VI. Metodología.....	45
A. Diagrama de Flujo.....	45
B. Método Analítico.....	46
1. Material y Equipo.....	46
2. Reactivos.....	47

	Página
3. Preparación de Fases Móviles y Diluentes.....	47
4. Preparación de Soluciones de Referencia y Muestras para HPLC.....	48
5. Preparación de Soluciones de Referencia y Muestras para UPLC.....	50
6. Procedimiento.....	51
7. Parámetros Cromatográficos.....	53
8. Cálculos.....	54
a) Cálculos Para el Sistema HPLC.....	54
b) Cálculos Para el Sistema UPLC.....	54
9. Validación del Método Analítico.....	55
VII. Resultados.....	57
VIII. Análisis de Resultados.....	67
IX. Conclusiones.....	71
X. Bibliografía.....	73
XI. Anexos.....	78

Al igual que cualquier otro tipo de industria, la farmacéutica exige día a día la producción en serie de más productos o servicios en menor tiempo exigiendo tener el mayor beneficio sin tener que sacrificar los sistemas de calidad que se necesitan cumplir ante cualquier institución pública o privada.

Estas exigencias que se deben cumplir en tiempo y forma pueden ser logradas en gran parte reduciendo los tiempos de análisis evitando la espera innecesaria de un resultado al día posterior del muestreo del granel ya que en unas cuantas horas puede ser obtenido el dictamen fisicoquímico mediante el uso del Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

En el presente trabajo se desarrollaron y validaron dos métodos analíticos tanto por HPLC como UPLC obteniéndose resultados satisfactorios para ambos sistemas, resultando métodos analíticamente equivalentes.

Se demostró experimentalmente que el uso del UPLC reduce el tiempo de análisis en 90% comparado con el sistema HPLC sin sacrificar la calidad de los resultados.

Así mismo se logró reducir el gasto de fase móvil de 2940 mL por HPLC a 102.9 mL por UPLC.

El costo del desarrollo y validación por UPLC es de 60.5 dólares y 4860 pesos menor que el desarrollado y validado por HPLC.

Los cromatogramas se realizaron a la misma escala en ambos sistemas para guaifenesina, bromhidrato de dextrometorfano, metilparabeno y propilparabeno observándose picos ligeramente mejor definidos en UPLC que los obtenidos por HPLC.

I. INTRODUCCIÓN

A un siglo de su descubrimiento, la cromatografía es una de las técnicas analíticas más utilizadas actualmente en diversos campos de aplicación de las ciencias químicas, ambientales, biológicas, bioquímicas, biomédicas, bromatológicas y farmacéuticas.

La metodología más utilizada en la industria farmacéutica es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) mejor conocida como High Performance Liquid Chromatography (HPLC por sus siglas en inglés).

Utilizada durante poco más de 40 años, la HPLC evolucionó de una manera extraordinaria llegando a ser una herramienta indispensable en la separación, aislamiento, identificación y cuantificación de las moléculas presentes en una sustancia o mezcla de compuestos e incluso de matrices biológicas tan complejas como sangre u orina.

El avance tecnológico ha permitido la optimización de las características de los materiales utilizados en el empaque de las columnas cromatográficas utilizadas en HPLC: aditivos de la fase móvil, tamaño, forma, estructura química y porosidad de partícula, lo cual ha permitido que día a día se realicen las determinaciones en un periodo de tiempo más corto con la precisión y exactitud requerida para un análisis cuantitativo.

Contar con una metodología por HPLC confiable hoy en día no es suficiente por lo que el usuario busca tecnología que le ofrezca reducción de tiempos de análisis para la oportuna entrega de resultados y a su vez el administrativo busca reducir costos. Esto en conjunto ha forzado al investigador y proveedor del servicio a crear tecnología de alta eficiencia a bajo costo para cubrir las expectativas del cliente.

Así es como la Ultra-HPLC se postula como una de estas nuevas alternativas tecnológicas. La separación de los componentes en un producto por UPLC se basa en los mismos principios de la HPLC pero con la disminución de los atributos de: tamaño de partícula en la fase estacionaria de 10 - 5 μm para HPLC y 2.1 - 1.7 μm para UPLC; volumen de flujo de

0.5 - 2.0 mL/min para HPLC a 0.1-0.5 mL/min para UPLC; volumen de inyección de 10 - 100 μ L para HPLC a 1-20 μ L para UPLC; aumento de la velocidad lineal de flujo, sensibilidad y resolución por último disminución en la concentración y cantidad de la fase móvil y tiempo de corrida cromatográfica.

II. MARCO TEÓRICO

A. Breve historia de la cromatografía

La cromatografía es una técnica que permite la separación de compuestos presentes en una mezcla. Esta técnica fué descubierta a principios del siglo XIX por un botánico ruso llamado Michael Tswett, al hacer pasar un extracto de plantas a través de un lecho de carbonato de calcio observó que los compuestos presentes en dicho extracto eran separados observándose como franjas coloridas a lo largo de la columna ver figura 1. El publicó su descubrimiento en la sección Biológica de la Sociedad de Naturalistas de Varsovia el 21 de marzo de 1903, en su artículo: "Por una Nueva Categoría de Fenómenos de Adsorción y su Aplicación en análisis bioquímicos" describía el proceso de separación.^{1,2}

"Si se filtra una solución de clorofila en éter de petróleo a través de una columna de adsorbente (yo empleo) principalmente carbonato de calcio, ya que puede empacarse con firmeza en un tubo de vidrio angosto), entonces se resuelven los componentes según una secuencia de adsorción, y se observan a lo largo del tubo diversas zonas de color... como los rayos del espectro visible, los componentes de la mezcla de pigmentos se resuelven en la columna de carbonato de calcio según una ley que puede estimarse de manera cualitativa y cuantitativa. Yo la he llamado cromatograma a este tipo de preparación y al método correspondiente lo he bautizado como método cromatográfico.

Es evidente que los fenómenos de adsorción aquí descritos no se restringen a los pigmentos de clorofila y se puede asumir que todo tipo de compuestos químicos coloridos o incoloros siguen las mismas leyes [Ref.: Tswett, Michael, 1906. Como se tradujo y se citó en *J. Chem. Ed.* 1959. 36:144 e *Ibid.* 1967. 44:235.]³

Así es como Tswett inspirado en las bandas coloridas dio el término de cromatografía al combinar dos palabras griegas *chromos* color y *graphos* escritura. Aunque el color tiene una pequeña e irrelevante relación en la cromatografía moderna para explicar los procesos de separación, el nombre ha persistido y todavía es usado para describir todas las técnicas de separación que emplean una fase móvil y una estacionaria. Desafortunadamente el trabajo de Tswett no fue desarrollado inmediatamente para lograr un alcance significativo; esto fue debido en parte a la obscuridad de la fuente del documento original y a la condenación del

método por Willstatter y Stoll, quienes experimentaron repitiendo el trabajo de Tswett, pero no hicieron caso del aviso de Tswett sobre evitar los adsorbentes agresivos y fallaron en sus experimentos.

La equivocación de Willstatter y Stoll fue particularmente catastrófica, ya que no solo retrasó el desarrollo de una técnica de separación muy importante, sino que también con esta acción fue inhibido el progreso en muchas otras ramas de la química.

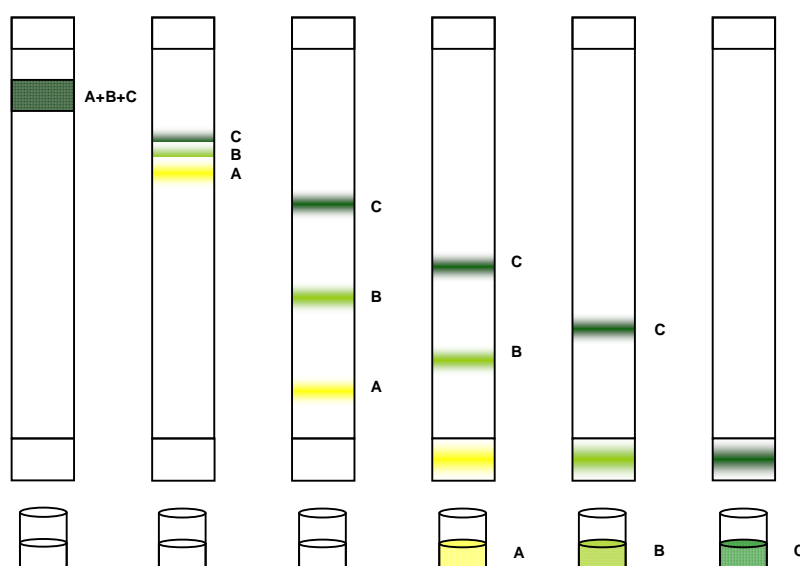


Figura 1. Ilustración de un experimento cromatográfico.

Lamentablemente, Tswett no pudo disfrutar de las ventajas de su invención. En lugar de ello, sólo se ocupó en posiciones relativamente menores, y en los últimos años de su vida se vio obligado a vagar de un lugar a otro. Murió en la flor de su vida, en 1919, sin poder lograr estos objetivos y sus logros fueron reconocidos sólo décadas después de su muerte.

Treinta años más tarde Kuhn y sus colaboradores tuvieron éxito repitiendo el trabajo original de Tswett y separaron Luteína y Xantina a partir de un extracto de plantas. No obstante el suceso de Kuhn y sus colaboradores fue despreciable en la validación del experimento de Tswett, la nueva técnica atrajo pequeñamente el interés y continuó su

proceso lenta y desilusionadamente. En 1941 Martin y Synge introducen la cromatografía líquido-líquido por el soporte de la fase estacionaria. Hicieron pasar agua sobre sílice en forma empacada y fue usada para separar algunos aminoácidos acetilados, con lo cual determinan que la eficacia más alta puede ser obtenible usando partículas muy pequeñas y una diferencia de alta presión a través de la columna.

No fue sino hasta dos décadas después, en 1963 que surge el renacimiento de la cromatografía líquida, madurada hasta obtener el poder de la alta resolución de problemas y separaciones rápidas. Los requerimientos de la HPLC.

La declaración hecha por Martin y Synge en 1941 contiene todas las condiciones necesarias para realizar las altas eficacias y resoluciones, alcanzadas por las columnas modernas de la HPLC. Sin embargo a pesar de sus recomendaciones, ha tomado casi cincuenta años traer sus conceptos para ser ventajosos, sustituir la fase móvil líquida por un gas para mejorar el índice de transferencia entre las fases y así realizar la separación. La recomendación fue dejada a James y Martin para traer el concepto a la realidad práctica en los años 50 y así la Cromatografía de Gases fue llevada a una nueva e importante era del desarrollo de la cromatografía

La cromatografía de gases creció de una novedad de laboratorio a una técnica analítica establecida popularmente en poco más de una década.

Como resultado del suceso encantador de la Cromatografía de Gases, la Cromatografía de Líquidos se convirtió en la cenicienta de la cromatografía y no fue hasta que los procesos principales de la Cromatografía Gaseosa fueron terminados que los científicos dieron vuelta a su atención de nuevo al desarrollo de la Cromatografía de Líquidos. En contraste con la Cromatografía de Gases el progreso de la Cromatografía de Líquidos ha sido lento y arduo, las dificultades encontradas en el desarrollo de la Cromatografía de Líquidos se presentaron a partir de dos causas: en primer lugar, las sustancias tienen una difusividad muy baja en los líquidos comparados con el de un gas y así, la cinética del intercambio entre las fases es lenta y se deben tomar las medidas especiales para alcanzar separaciones eficientes; en

segundo lugar, las concentraciones muy bajas de un soluto en un líquido no modifican las propiedades del líquido al mismo grado que hacen a los de un gas y ésta ha hecho el desarrollo más difícil y lejano de los detectores de la Cromatografía de Líquidos actual, la Cromatografía de Líquidos es una técnica establecida de la separación que, a la sorpresa de muchos, ha establecido un campo del uso más lejano que el de la Cromatografía de Gases y actualmente es la técnica mas usada en el mundo.⁴

B. Definición de Cromatografía

Según la IUPAC, la cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a ser separados se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es inmóvil (fase estacionaria), mientras que el otro (la fase móvil) se mueve en una dirección definida.⁵ Una definición tan general como esta es debida quizá a la diversidad de los métodos cromatográficos existentes.

De acuerdo con Scott la cromatografía es un proceso de separación que se logra mediante la distribución de sustancias entre dos fases, una fase estacionaria y la fase móvil. Los solutos distribuidos preferentemente en la fase móvil se desplazarán más rápidamente a través del sistema que las distribuye preferentemente en la fase estacionaria. Por lo tanto, los solutos eluyen con el fin de aumentar sus coeficientes de distribución con respecto a la fase estacionaria.

Existen diversas definiciones acerca de la cromatografía, todas ellas acertadas sin embargo quizás por ello sea conveniente, solo relacionar la cromatografía con un método separativo y aceptar la definición de Guddings: un “método de migración en zonas”, abriendo la mente ante los cambios que continuamente se producen.⁶

La idea de la HPLC siglas que se debieron a “High Pressure Liquid Chromatography”, debieron ser cambiadas cuando los cromatografistas se dieron cuenta de que la presión solo constituía una herramienta que forzaba a la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse por sí en una variable del sistema. Sin embargo y ante la universalidad

consumada del término HPLC se decidió simplemente buscarle otro significado, resultando “High Performance Liquid Chromatography”.⁷

C. Bases de la Separación

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (salir de la columna) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes. Para ilustrar este proceso la figura 2 muestra partículas de la fase estacionaria, moléculas de solvente (de la fase móvil) y moléculas de soluto (A, B, C), constituyentes de la muestra en ensayo.

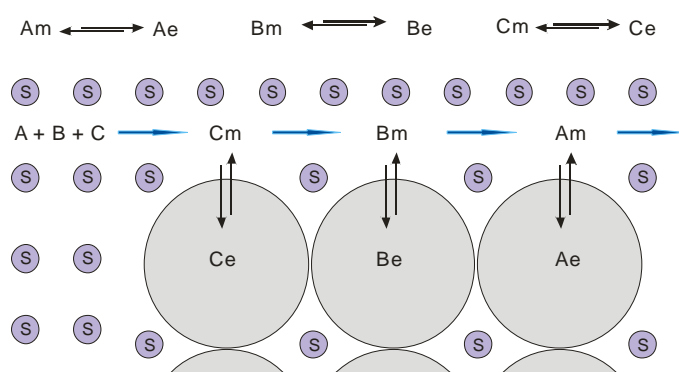


Figura 2. Separación hipotética de los solutos A, B y C, en equilibrio entre la fase móvil (m) y la estacionaria (e) S representa las moléculas de la fase móvil.

Representando con el subíndice “m” la fracción del soluto disuelto en la fase móvil y con el subíndice “e” el disuelto en la fase estacionaria. Dejando momentáneamente de lado la modalidad de exclusión por tamaño molecular, las características químicas de las especies A, B y C pueden ser, en relación a las moléculas de solvente y a los grupos funcionales forzados por ésta última. Como resultado, en este ejemplo hipotético, las moléculas de A viajarán a mayor velocidad que las de B y estas a mayor velocidad que las de C. Para que C eluya de la columna, será necesario que un determinado volumen de fase móvil (eluyente),

llamado volumen de elusión, atraviese la columna. El volumen de elusión será entonces diferente y creciente para A, B y C. Por otra parte, si se trabaja a volumen constante (la modalidad habitual en HPLC), el volumen de elusión de cada especie será proporcional a un tiempo conocido como tiempo de retención o de elusión ver figura 3. La distribución del soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil está definido por el coeficiente de distribución (K) determinado bien sea por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en cuestión y representa el equilibrio del soluto entre la fase estacionaria X_e y la fase móvil X_m

$$K = \frac{X_e}{X_m} \quad (1)$$

Cuando $K = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases y la separación es ineficiente. Cuando el factor de capacidad para una especie es mucho menor que la unidad, la elusión tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención. Si es igual o mayor a 20, los tiempos de retención son demasiado largos. Idealmente las separaciones se realizan en condiciones donde los factores de capacidad para las especies de una mezcla oscilan entre 1 y 5.^{8,9,10}

El factor de capacidad (k') es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas. Para una especie A, el factor de capacidad k'_A se define como:

$$k'_A = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (2)$$

D. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Mejor conocida como High Performance Liquid Chromatography (HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica que consiste en hacer pasar fase móvil a través de una columna de manera constante con lo cual se consiguen altas presiones hasta mantener un sistema plenamente equilibrado entre la fase móvil y la estacionaria, después de lo cual se inyectan una pequeña cantidad de muestra a través del puerto de inyección, esta eluye a través de la columna y los componentes son separados mediante interacciones repetidas de cada analito

con la fase estacionaria de la columna, al final los componentes de la muestra separados gradualmente en bandas de distribución normal gaussiana consiguen ser detectados. El detector que responde a la presencia de los solutos proporciona una señal en función del tiempo y se obtienen una serie de picos que se representan en un gráfico denominado cromatograma ver figura 3, él cual es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo.

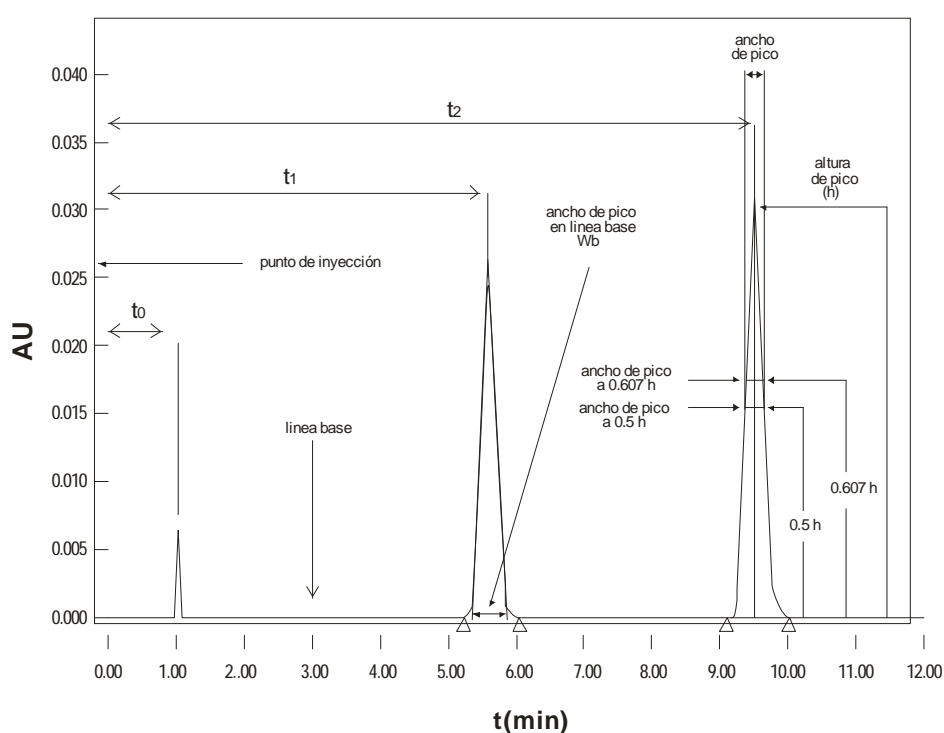


Figura 3. Cromatograma típico en CLAR

1. Parámetros en HPLC

Del cromatograma presentado se pueden introducir las siguientes definiciones para CLAR:

Línea base: La porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elusión de la fase móvil, sin señal debida al analito.

Tiempo muerto (t_0): El tiempo transcurrido entre la inyección y la elusión de un soluto no retenido, representa el espacio vacío de la columna.

Tiempo de retención (t_r): El tiempo transcurrido entre la inyección y la elusión del pico máximo de cada compuesto.

Tiempo de retención ajustado (t'_r): Tiempo que el componente permanece en la fase estacionaria y se define por:

$$t'_r = t_r - t_0 \quad (3)$$

Volumen muerto (V_0): El volumen de fase móvil que pasa a través de la columna durante el t_0 .

$$V_0 = Qt_0 \quad (4)$$

Donde (Q) es la velocidad de flujo que pasa a través de la fase móvil a través de la columna en mL/min.

Volumen de retención (V_r): El volumen de fase móvil que pasa a través de la columna entre la inyección y el pico máximo de cada compuesto.

Ancho a la base (W_b): Es la porción de la línea base interceptada por las tangentes al pico y para un pico gaussiano es igual a cuatro, tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema.

Ancho a la mitad de la altura ($W_{1/2}$): Una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos).

Altura de pico (h): La distancia desde el ápice a la línea base se representa por (h) y la altura a la mitad del pico por ($h_{1/2}$).

Velocidad lineal (u): La velocidad a la cual la fase móvil se desplaza a través de la columna no es sólo función del caudal sino también de la sección interna de la misma, la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno hace preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Si “L” es la longitud de la columna expresada en cm y t_0 es el tiempo muerto medido en segundos, la velocidad lineal en cm/s puede calcularse como.

$$u = \frac{L}{t_0} \quad (5)$$

Número de platos teóricos (N): Representan el poder de separación de una columna, mientras mas alto sea este número mayor será el poder de separación de una columna, este número se puede conocer utilizando la fórmula siguiente:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (6)$$

Resolución (R): Es la separación de los picos a nivel de línea base, constituye una medida cuantitativa de la eficiencia de separación de dos componentes en una mezcla, y se define como:

$$R = \frac{2 [t_{r2} - t_{r1}]}{W_2 + W_1} \quad (7)$$

Una separación de dos componentes se considera incompleta cuando su valor es \leq de 0.75, mientras que si su valor es mayor a 1.5 la separación se considera esencialmente completa. La resolución puede mejorarse alargando la columna o modificando los componentes de la fase móvil, aumentando así el número de platos teóricos.

Factor de selectividad (α): El factor de selectividad de una columna define la habilidad del sistema para separar dos especies, por ejemplo A y B; y se puede calcular por la siguiente formula:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0} \quad (8)$$

Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. A diferencia de k' , no depende de la fuerza de elusión, sino de la afinidad del soluto respecto de la fase móvil y de la columna.

Factor de coleo (T): Algunas veces es útil establecer un factor de coleo para limitar el máximo permisible con relación a la asimetría del pico, este se define como la relación de la distancia del ancho del pico ($W_{0.05}$) dividido entre dos veces la distancia, (f), del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5% de la altura partiendo de la línea base. Para un pico simétrico el factor de coleo va siendo más pronunciado y el cálculo se expresa de la siguiente forma:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad (9)$$

El modelo cromatográfico supone que la cromatografía en columna tiene un gran número de capas separadas, llamadas platos teóricos. A través de los equilibrios de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil se producen estos platos ver figura 4. Es importante recordar que las placas realmente no existen, son una invención de la imaginación que nos ayuda a comprender los procesos en el trabajo de la columna, esto sirve también como una forma de medir la eficiencia de la columna, o bien declarando el número de platos teóricos en una columna ecuación (6) o declarando la altura equivalente de un plato teórico HETP.

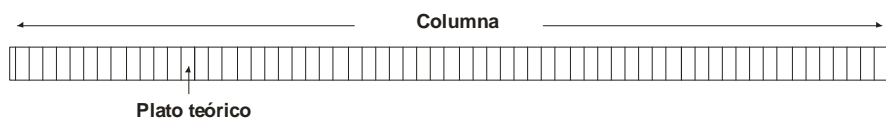


Figura 4. Interpretación de los platos teóricos en una columna.

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (10)$$

De esta ecuación se puede observar que las columnas se comportan como si tuvieran diferentes platos para los diferentes solutos de la muestra.

2. La ecuación de van Deemter

En una descripción más realista del movimiento de soluto por una columna cromatográfica se toma en cuenta la velocidad finita a la cual el soluto puede equilibrarse entre las fase móvil y estacionaria. Esto es, el equilibrio no es infinitamente rápido (como se supone en la teoría de platos), y la forma resultante de las bandas depende de la velocidad de elusión. De dicha forma también depende de la difusión del soluto a lo largo de la columna y de la existencia de diferentes caminos que las diversas moléculas de soluto pueden seguir cuando se mueven entre partículas de la fase estacionaria.

Todos los efectos que se mencionan dependen de la velocidad, (**u**) con que la fase móvil atraviesa la columna. La consideración detallada de los diversos mecanismos por los que la banda se ensancha conducen a la ecuación de van Deemter para la altura equivalente de plato:

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (11)$$

Donde A, B y C son constantes características de un sistema dado de columna y solvente. La ecuación (11) indica que existe una velocidad óptima para la operación de cualquier columna, a la cual la altura de plato (HETP) alcanza su valor mínimo ver figura 5.

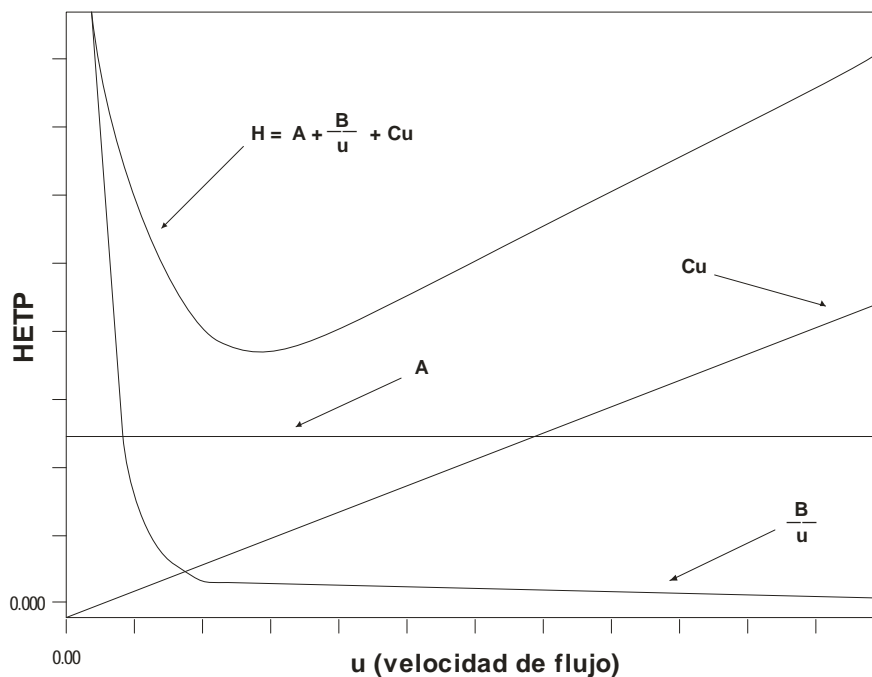


Figura 5. Aplicación de la ecuación de van Deemter a la cromatografía de líquidos, los Parámetros de van Deemter son $A = 1.65 \text{ mm}$, $B = 25.8 \text{ mm}^2\text{mL}/\text{min}$ y $C = 0.0236 \text{ mm}^2\text{min}/\text{mL}$

En seguida se examina cada término de la ecuación de van Deemter para entender la dependencia de la HETP respecto a la velocidad. Primero, es preciso advertir que cualquier mecanismo que provoque el ensanchamiento de una banda de soluto incrementará la altura del plato teórico. Por ello, cada término de la ecuación (11) representa un mecanismo de ensanchamiento de zona.

Considerando la difusión longitudinal de un soluto cuando atraviesa una columna, puesto que la concentración de soluto es menor en los bordes de la zona del soluto que en el centro, el soluto se difunde siempre hacia los bordes de la zona. A mayor tiempo pasado por el soluto en la columna, mayor ensanchamiento por difusión. Esto da por resultado el término B/u de la ecuación de van Deemter. A mayor velocidad de la fase móvil, menor es el tiempo pasado en la columna y menor la difusión.

El término C resulta del tiempo finito que requiere el soluto para que se establezca el equilibrio entre las fases móvil y estacionaria. Considérese un instante en el que una parte del soluto está en cada fase. Si la fase móvil se mueve rápidamente y si el soluto no puede escapar con rapidez respecto a la zona en la fase estacionaria, el resultado es un ensanchamiento de la totalidad de la banda de soluto. A mayor velocidad (**u**) mayor es el ensanchamiento. El término C expresa este efecto.

El término A de la ecuación de van Deemter se debe a que el soluto recorre múltiples trayectorias de distintas longitudes. La existencia de este efecto es aproximadamente independiente de la velocidad.

La condición óptima se representa cuando la HETP es mínima. A velocidades menores que la óptima, la difusión longitudinal causa un ensanchamiento de la banda y un incremento en la altura de las fases provoca que el soluto se extienda.

Para un tipo dado de fase estacionaria, a menor tamaño de partícula mayor eficiencia de la columna. Esto se debe a que el soluto debe recorrer distancias más cortas para alcanzar el equilibrio con las partículas más pequeñas de la fase estacionaria. El tamaño de partículas de las columnas de HPLC es de aproximadamente 10 μm a 5 μm . A menor diámetro de partícula, mayor es el gasto óptimo. Las columnas empacadas con partículas muy pequeñas oponen gran resistencia al flujo del solvente. En consecuencia, se requieren altas presiones para trabajar con las más eficientes columnas de cromatografía de líquidos.⁸

Como los coeficientes de difusión de los gases son mayores que los de los líquidos, el gasto óptimo, es mayor en la cromatografía de gases que en la técnica para líquidos, aún cuando es posible operar un cromatógrafo de gases por debajo de su gasto, es raro que en la cromatografía de líquidos el gasto esté por debajo de su valor óptimo. En la mayoría de los casos, la disminución del gasto incrementa la eficiencia (reduce la HETP) de una columna de cromatografía de líquidos.^{8, 9, 11, 12}

3. Ultra Performance Liquid Chromatography

Si bien es cierto que la HPLC es una de las técnicas más utilizada en la mayoría de laboratorios de todo el mundo durante los últimos 30 años, el crecimiento de esta técnica ha sido principalmente por la evolución de los materiales de empaque bajo los principios de esta evolución han sido gobernados por la ecuación (12) de van Deemter. Entre la velocidad lineal y la altura equivalente del plato teórico (HEPT o eficiencia de la columna). Desde que el tamaño de partícula es una variable de la ecuación, una curva de van Deemter es usada para investigar el desempeño cromatográfico.

De acuerdo con la ecuación al disminuir el tamaño de partícula a menos de 2.5 μm no solamente se obtiene una ganancia significativa sino que adicionalmente aumenta la eficiencia y no disminuye la velocidad lineal de flujo.

A medida que el tamaño de partícula es más pequeño existe una menor separación entre partículas lo cual aumenta la presión en el sistema, en este caso presiones que oscilan entre los 10 000 y 15 000 psi.¹³

Los proveedores de equipos de cromatografía compiten en esta ardua carrera para proporcionar al cliente un equipo con columnas eficientes los cuales ayudan a disminuir a significativamente el tiempo requerido para llevar a cabo un análisis por HPLC. Dentro de estas empresas se encuentra Shimadzu[®] quien ha probado sus equipos UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) y columnas Shim-pack XR-ODS[®] de 75 mm de longitud (L) por 3.0 mm de diámetro interno (DI), con tamaño de partícula de 2.1 μm de diámetro en su material de empaque. Reduciendo con esto importantemente los tiempos de análisis para la determinación de drogas en orina, barbitúricos, benzodiazepinas, analgésicos, cortisol y los principales compuestos en bebidas como acesulfame, ácido benzoico, sorbato de potasio cafeína y aspartame.^{14,15,16,17,18,19}

Por otra parte Waters[®] proporciona los equipos Acquity[®] UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) con columnas Acquity BEH C₁₈[®] de 50 mm de longitud por 2.1 mm de

diámetro interno y 1.7 μm de tamaño de partícula en su material de empaque también ha probado su eficiencia reflejada en la eficiencia y aumento de los platos teóricos. La tecnología del material de empaque de las columnas Acquity BEH (Bridged Ethyl Hybrid) le confiere una resistencia especial a variaciones de pH que van desde 1.0 a 13.0.

Actualmente la tecnología que brinda Waters con los equipos y columnas Acquity es utilizada principalmente en la industria como una alternativa de HPLC en el desarrollo para el análisis de nuevos compuesto farmacéuticos.²⁰ También se ha probado su eficiencia en el área médica por el análisis de oligonucleótidos²¹ y en el área química legal mediante la determinación de anfetaminas en análisis forense y toxicológico.²²

4. Equipos en cromatografía de líquidos

Un equipo moderno de HPLC dispone de uno o más recipientes de vidrio de una capacidad de 500 a 1000 mL para la fase móvil, una bomba que empuja la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector que introduce la muestra a la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un aparato para recolectar los datos, como una computadora o integrador ^{23,24}

a) Características HPLC

1. Sistema de bombeo. Las micropartículas de las columnas, entre 3 y 10 μm , desarrollan una alta resistencia a la presión durante la operación. Esto acarrea que sea necesario disponer de ciertos requisitos para el sistema de bombeo empleado en CLAR e incluyen: (1) la generación de presiones por arriba de 6000 psi (lbs/in²), (2) un flujo libre de pulsaciones, (3) un intervalo de flujo de 0.1 a 10 mL/min., (4) simplicidad de operación y reproducibilidad del flujo mejor del 0.5 % relativo y (5) componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón). Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas (que se utilizan en aproximadamente el 90 % de los equipos de CLAR), bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante ver figura 6.



Figura 6. HPLC Waters

2. Inyectores. A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se agrava por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser pequeños de unas pocas décimas de μL y además se debe introducir la muestra sin despresurizar el sistema. Existen dos diseños de inyectores: los de desplazamiento y los de aguja. Ambos pueden ser incorporados a un sistema de inyección manual o automático. Los inyectores de desplazamiento fuerzan la muestra hasta un loop (un tubo de acero inoxidable de diámetro interno pequeño y de volumen fijo, lo que permite inyectar el mismo volumen de muestra), pero presentan baja reproducibilidad cuando están parcialmente llenos. En consecuencia, es necesario cambiar físicamente el loop para cambiar los volúmenes de inyección. Los inyectores de tipo aguja conducen la muestra a través del loop. Este mecanismo puede operar con precisión con un loop parcialmente lleno y es, por lo tanto, más versátil.
3. Columnas. La columna contiene la fase estacionaria necesaria para la separación deseada. Están construidas con una pared gruesa de acero inoxidable, el interior es liso, de diámetro interno uniforme y el relleno se mantiene con filtros de acero poroso. La

mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud de 100 a 300 mm., aunque hay más cortas o largas ver figura 7.



Figura 7. Columnas Cromatográficas longitudes 300 mm y precolumna, 250 mm, 150 mm, 150 mm, 100 mm y precolumna integrada, 100 mm y 50 mm, Diámetro Interno variable, las cuatro primeras utilizadas en análisis por HPLC y las tres últimas utilizadas en análisis por UPLC con tecnología e-coord.

El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de 3, 4 y 10 μm , tal vez la columna más utilizada es la de 250 mm x 4.6 mm y 5 μm de tamaño de partícula, estas tienen de 40 000 a 60 000 platos/ m^2 . La columna por lo común se mantiene a temperatura

ambiente y en algunos sistemas se coloca en un horno cuya temperatura puede regularse. Recientemente, se han empezado a fabricar columnas de alta resolución, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas. Estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm y se rellenan con partículas de 3 o 5 μm . estas columnas tienen hasta 100 000 platos/ m^2 y presentan la ventaja de rapidez y mínimo consumo de disolvente. En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión ver figura 7.²⁶

4. Disolventes. En todas las formas de cromatografía, la calidad y la manipulación de los disolventes a emplear en la preparación de la fase móvil es tan crítica como cualquier parte del sistema cromatográfico. A fin de no degradar costosas columnas de CLAR y minimizar el ruido de fondo en el detector, los disolventes utilizados deben ser muy puros. La primera rutina que se debe llevar a cabo con la fase móvil. antes de introducirlos en el recipiente, es la filtración a vacío con filtros de tamaño de poro de 0.22 a 0.45 μm para eliminar los gases y la materia en suspensión ver figura 6. El tubo de entrada al depósito de los disolventes se protege con un filtro de poro fino el cual retiene partículas de polvo mayores de 2 a 5 μm . Las burbujas que se forman por cambios de presión o por mezclado de ciertos disolventes interfieren en el funcionamiento adecuado de la columna y del detector. En consecuencia, de manera sistemática se eliminan los gases de los disolventes por medio de evacuación, ebullición, ultrasonido o purga con helio (el cual es muy insoluble). Una separación en que se utiliza un solo disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante se denomina una elución isocrática. Con frecuencia, la eficiencia de la separación se aumenta notablemente por una elución por gradiente. En este caso una vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes empleados de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas. Los equipos de CLAR se encuentran equipados con unos dispositivos que permiten introducir los disolventes desde dos o más

recipientes en una cámara de mezcla a una velocidad que varía continuamente y la relación de volumen de los disolventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo.^{25, 26}

5. Detectores. El detector ideal debe de ser (1) sensible a bajas concentraciones de cualquier analito, (2) dar una respuesta lineal (señal proporcional a la concentración del analito) en un amplio intervalo de concentraciones, (3) de buena estabilidad y reproducibilidad, (4) de baja respuesta a los cambios de temperatura, (4) con un tiempo de respuesta corto y (5) de alta fiabilidad y de manejo sencillo. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la disolución, que responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifican por la presencia del analito. Y los detectores basados en una propiedad del soluto, que responden a una propiedad del analito, como la absorbancia ultravioleta, fluorescencia o intensidad de difusión. Los sistemas de detección más empleados en CLAR son los de absorbancia ultravioleta-visible, arreglo de diodos ver figura 6, índice de refracción y electroquímicos, pero existen otros detectores que son capaces de proporcionar información estructural, como por ejemplo el espectrómetro de masas.⁽⁴⁾

b) Características UPLC

El Sistema Acquity UPLC consiste de una bomba binaria de solventes, un muestreador de 96 viales dividido en 2 platos independientes (A y B), colocando la ubicación de los viales por coordenadas, es decir, A1, A2, etc., incluyendo un horno de columnas, detector PDA detector de arreglo de diodos por sus siglas en Inglés o TUV Ultravioleta-Visible por sus siglas inglés ver figura 8.²⁵

La bomba binaria de solventes usa 2 flujos independientes, es decir, las dos bombas proporcionan el flujo necesario para ser utilizados con solventes mezclados en gradientes a alta presión. Incluye un desgasificador que sirve para cualquiera de las 4 líneas del solvente seleccionado.

Todo esto a un límite de 15,000 psi de presión (alrededor de 1000 bar), esto es una gran ventaja en partículas de 2 μm al eluir, ya que esto representa una mejor resolución en menor tiempo.



Figura 8. Acquity UPLC con detector de arreglo de diodos, bomba binaria automuestreador y horno para columnas.

El muestreador incorpora una nueva tecnología, la poca dispersión es mantenida usando presión a la hora de inyectar muestras y una serie de transductores de presión facilitan el monitoreo y el diagnóstico de las inyecciones. El muestreador usa lo que se llama “aguja en aguja” que provee de robustez y exactitud al momento de inyectar las muestras. Los ciclos de las inyecciones son de 25 segundos con un lavado de agujas de 60 segundos que proporciona una disminución del llamado “carry over”, es decir, línea base mejor definida sin tanto ruido. Las muestras colocadas en platos de muestreo por coordenadas y dentro de una cámara, se puede controlar la luz y temperatura. Se puede inyectar de 0.1 μL a 20 μL como máximo, además de controlar flujos desde 0.01 mL/min hasta 2.0 mL/min como máximo. En

el horno de las columnas se pueden alcanzar temperaturas hasta 65 °C. El detector PDA es muy versátil ya que se puede acoplar a un detector espectrómetro de masas MS por sus siglas en inglés y disminuir las dispersiones de las muestras.^{26, 27}

El detector TUV-VIS y el detector PDA un nuevo soporte electrónico, Ethernet communications y una gran cantidad de datos para detección en UPLC pueden ser usados, el detector del Sistema Acquity UPLC consiste de una celda de flujo equivalente a una fibra óptica.^{26,}

E. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio que las características del funcionamiento del método satisfacen con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Los parámetros a evaluar durante la validación de un método depende de la aplicación que se le de a éste. La USP 30 en pruebas generales <1225> establece 3 categorías para los métodos analíticos.

Categoría I: ensayos desarrollados para cuantificar el componente mayor de la formulación (activos) y conservadores.

Categoría II: ensayos que son usados para la determinación de impurezas o productos de degradación en producto terminado. Estos incluyen ensayos cuantitativos y/o pruebas limite.

Categoría III: ensayos usados para determinar la biodisponibilidad de un activo en producto terminado.

Apegándose a esta clasificación, la validación de los métodos analíticos utilizados para la finalidad de este proyecto corresponde a la categoría I. Lo cual requiere que se evalúen los siguientes parámetros:

Exactitud

Precisión

Linealidad

Tolerancia

Robustez

Adecuabilidad del sistema (para métodos cromatográficos)

Para comprender de forma clara cada uno de los parámetros de la validación en seguida se presentan sus definiciones:

Linealidad: Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado. Esta definición aplica para método y sistema.

Intervalo: Las concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo estas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de las muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

Reproducibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (diferentes días, analistas, laboratorios y equipos).

Robustez: Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

Especificidad: Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia: Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos, columnas, lotes de reactivos. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que en el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia se refiere a la influencia de factores externos del método.

Estabilidad analítica de la muestra: Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Adecuabilidad del sistema: Si las mediciones son sensibles a las variaciones en las condiciones de análisis, estos deben incluirse en el procedimiento. En consecuencia la evaluación de la solidez y robustez debe ser una serie de parámetros establecidos en la adecuabilidad del sistema para garantizar que la validez del procedimiento analítico se mantiene siempre que sea utilizado. Son variaciones típicas la estabilidad de las soluciones

analíticas, analistas y equipos diferentes. En el caso de la cromatografía líquida, son típicas las variaciones de pH de la fase móvil, composición de la fase móvil, diferentes lotes o suministros de columnas, la temperatura y el caudal.

La adecuabilidad del sistema se basa en el concepto de que el equipo, la electrónica, las operaciones de análisis y las muestras para ser analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar y establecer los parámetros de adecuabilidad serán determinados dependiendo del tipo de procedimiento que sea evaluado estos son especialmente importantes en el caso de los procedimientos cromatográficos si las medidas son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas.^{26, 27}

F. Principios activos y excipientes

1. Guaifenesina

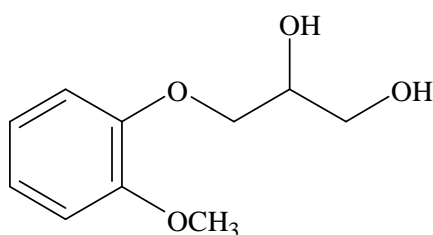


Figura 9. Estructura química guaifenesina

Nombre científico: 3-(2-Metoxifenoxi)-1,2-propandiol

Sinónimos: Eter glicérico de guayacol, Guayacol gliceril eter, Guayacolato de glicerilo, o-Metoxifenil Gliceril eter, Eter guayacol glicerilo

Fórmula condensada: C₁₀ H₁₄ O₂

Peso molecular: 198.2

CAS: 93-14-1

T_{fus}: Entre 78° C y 79.5° C

Descripción: Polvo cristalino blanco a ligeramente gris, con sabor amargo; puede tener un ligero olor característico; estable a la luz y el calor, no higroscópico; el pH de una solución 1 en 100 es de 5 a 7.^{28,29}

Solubilidad: 1g en 20 mL de agua a 25 °C, mucho más soluble en agua caliente; soluble en alcohol, cloroformo, glicerina, propilenglicol DMF; moderadamente soluble en benceno, prácticamente insoluble en éter de petróleo.^{29,30}

Coefficiente de partición: Log P (octanol/agua) 1:4.³⁰

Mecanismo de acción: La guaifenesina o guayacolato de glicerilo es una sustancia semisintética cuya acción expectorante es superior a la del cloruro de amonio ya que es capaz de aumentar las secreciones del tracto respiratorio en un 121%.^{30,31}

La guaifenesina es un expectorante activo que tiene la propiedad de aumentar las secreciones del tracto respiratorio. Mediante este efecto fluidifica la expectoración disminuyendo la viscosidad de las secreciones en la traquea y bronquios, un efecto terapéutico útil en los casos de tos improductiva o seca.³¹

La acción expectorante de la guaifenesina obedece a un reflejo que tiene su punto de partida al provocar irritación de la mucosa gástrica. El fluido del tracto respiratorio en un 180-200% después de su administración y de gran efecto en los procesos de tos causada por diversas etiologías virtualmente sin efectos adversos.³¹

Clínicamente su eficacia está asociada con la reducción y viscosidad de las secreciones bronquiales lo que permite la recuperación pronta del paciente.³¹

Farmacocinética y farmacodinamia: La guaifenesina es bien absorbida desde el tracto gastrointestinal, su vida media de eliminación es de aproximadamente una hora, y como otros expectorantes se elimina principalmente por vía urinaria como medicamento sin cambios y como metabolitos.^{31, 32}

Indicaciones: Esta indicado como expectorante en el tratamiento sintomático temporal de la tos debido a infecciones leves del tracto respiratorio superior, tal como sinusitis, faringitis y bronquitis, cuando estas se complican con mucosidad viscosa y congestión.^{31, 33, 34}

Es utilizada como un expectorante en el manejo sintomático de la tos asociada con: resfriado común, bronquitis, laringitis, faringitis,

pertussis, influenza, sarampión y la tos provocada por la sinusitis paranasal crónica.^{31, 33,34}

Contraindicaciones: Hipersensibilidad a la guaifenesina o cualquier componente de la formulación.

Factor de riesgo en el embarazo: No debe administrarse en mujeres gestantes. Estudios realizados encontraron incidencias de hernias inguinales en los neonatos de mujeres que tomaron guaifenesina durante el embarazo.^{35, 36}

Lactancia: No se sabe si la guaifenesina se distribuye en la leche materna. No se han documentado problemas en humanos, por lo cual se debe tener precaución al utilizarlo en el periodo de lactancia.

Pediatría: Se recomienda precaución en niños a partir de 12 años de edad con tos persistente o crónica, tal como sucede con el asma, o si la tos es acompañada por excesiva flema (mucosidad). La condición de estos niños debe ser evaluada antes de administrárseles guaifenesina. No debe ser administrada en niños menores de 2 años sin antes ser recomendado por el médico.

Geriatría: No se han documentado problemas geriátricos específicos hasta la fecha.

Interacciones La guaifenesina puede interferir las determinaciones analíticas del ácido 5-hidroxiindolacético y VMA (ácido vanilmandélico). Las determinaciones urinarias serían falsamente incrementadas porque los metabolitos de la guaifenesina interfieren con el color.

Se Debe discontinuar el tratamiento 48 horas antes de la recolección de orina para estas pruebas.^{31, 34, 35}

Reacciones adversas: Frecuencia no definida:

Sistema nervioso central: Mareos, dolor de cabeza.

Dermatológicos: Salpullido, urticaria, rash cutáneo.

Endocrino y metabólico: Disminución de los niveles de ácido úrico.

Gastrointestinales: Nauseas, vómito, dolor de estomago, diarrea.

Casos reportados post-comercialización: Formación de piedras en los riñones con el consumo de dosis altas.³⁵

Precauciones:

Cuando es utilizado para automedicación (en formulaciones de venta libre, notificar a un proveedor de la salud si los síntomas no mejoran en 7 días, o se acompañan de fiebre, salpullido o dolor de cabeza persistente. No utilizar en tos crónica persistente (como en el caso de fumadores, asmáticos, en bronquitis crónica y enfisema) o si la tos se acompaña de una cantidad excesiva de flema, a menos de que sea indicado por un profesional de la salud. La guaifenesina no está aprobada para uso en productos de venta libre en niños menores de 2 años de edad. Algunos productos pueden contener fenilalanina.³⁵

La seguridad y eficacia no han sido establecidas en niños menores de 2 años. Uso no recomendado en niños menores de 2 años. (2) No se prevén problemas específicamente geriátricos en este grupo de edad. Uso aceptado.³⁵

Dosis de guaifenesina mayores a la dosis requerida para la acción expectorante pueden producir emesis.³⁵

Advertencias: Si presenta algún problema con el medicamento consulte a su médico.³⁵
Es aconsejable tomar un vaso de agua tibia, después de cada dosis del medicamento para ayudar a la pérdida de mucus en los pulmones.³⁵
Si olvidó una dosis, tomarla cuanto antes, no tomar si están cerca la hora de la próxima dosis, no doblar la dosis. Consultar con el médico si la tos persiste, después de usar la medicación por 7 días, o si la tos se presenta con fiebre alta, rash cutáneo, dolor de cabeza o inflamación de garganta.³⁵

Mantener una hidratación adecuada.

Tratamiento en caso de sobredosis: En caso de sobredosis aguda vaciar el estómago, induciendo el vómito por lavado gástrico.

Vía de administración: Oral

Dosis: Adultos, adolescentes y pacientes geriátricos: como expectorante 200 mg a 400 mg cada 4 horas, sin exceder de 2 400 mg diarios.^{31, 34, 35}
Pediátricos: como expectorante
Niños de 6 meses a 2 años
25 mg a 50 mg cada 4 horas, no exceder de 300 mg diarios
Niños de 2 a 6 años
50 mg a 100 mg cada 4 horas, no exceder de 600 mg diarios
Niños de 6 a 12 años
100 mg a 200 mg cada 4 horas, no exceder de 1200 mg diarios

2. Dextrometorfano Bromhidrato

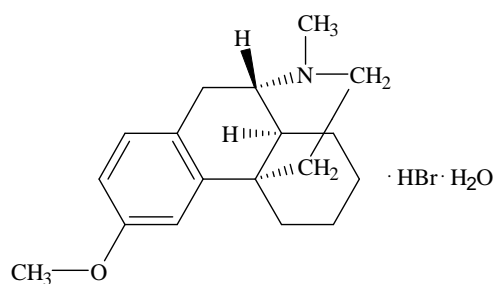


Figura 10. Estructura química bromhidrato de dextrometorfano

Nombre científico: (+)-3-metoxi-9a-matilmorfina

Sinónimos: Dextrometorfano
Bromhidrato monohidrato

Fórmula condensada: C₁₈H₂₅NO, Br, H₂O

Peso molecular: 370.3

CAS: 125-69-9 anhidro
6700-34-1 monohidrato

T_{fus}: 124-126 ° C

Descripción: Polvo blanco o sólido cristalino ligeramente blanco, inodoro o con un ligero olor característico.^{37, 38, 39}

Solubilidad: 1 g en 60 a 75 ml de agua, 1 en 10 de alcohol, libremente soluble en alcohol y cloroformo con separación de agua; prácticamente insoluble en agua y éter. Una solución al 1% (USP) o 2% (BP) en agua da un pH de 5.2 a 6.5. Almacenar en contenedores libres de aire.^{36, 37}

Mecanismo de acción: Presenta características de un antitusígeno de acción central, aumentando el umbral del reflejo correspondiente por un mecanismo asociado a una interacción con receptores opiáceos μ y κ . Su potencia antitusígena es similar a la de la codeína. Controlando los espasmos de tos al deprimir el centro tusígeno del bulbo raquídeo.^{40, 41}

Farmacocinética: Se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal. Su actividad se presenta rápidamente a los 15 minutos después de su administración oral, en ocasiones se prolonga de 8 h hasta 12 h;

es metabolizado en el hígado y su vida media en plasma es de aproximadamente 11 hrs. Una pequeña cantidad de la droga es excretada sin cambios por orina, de 1 - 10% se excreta por las heces y 50% es eliminada por la orina 24 horas después de su administración. Y al parecer hay dos fenotipos distintos para este proceso de oxidación, lo cual resulta en una alta variabilidad de la farmacocinética entre los sujetos.^{39,42}

Indicaciones: Es un antitusivo que alivia la tos irritativa, por su actividad inhibitoria sobre el reflejo tusígeno.³⁹

Contraindicaciones: No debe ser administrado a pacientes con hipersensibilidad, que estén en tratamiento con inhibidores de la MAO, con gastritis úlcera péptica, tos crónica, asma o enfisema, no se debe usar con inhibidores del SNC.³⁹

Factor de riesgo en el embarazo: No debe de ser administrado a la mujer durante el embarazo ni lactancia de acuerdo a recomendaciones generales del uso de fármacos.³⁹

Lactancia: Atraviesa la barrera placentaria y se distribuye hacia la leche materna.³⁹

Interacciones No debe ser administrado con otros opiáceos, inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO), antidepresivos tricíclicos, barbitúricos y fenotiazinas.³⁹

Reacciones adversas: Ocasionalmente se pueden presentar náuseas, vómito, erupciones cutáneas, trastornos gastrointestinales, excitación y somnolencia. En dosis elevadas puede producir depresión del sistema nervioso y dificultad para respirar.^{37, 39}

Sistema nervioso central: Antitusivo opiáceo de acción central, compartiendo las propiedades depresoras de este grupo de fármacos, induciendo una sedación o somnolencia.^{37, 39}

Dermatológicos: No se describen afectaciones.

Endocrino y metabólico: Experimenta metabolismo rápido y extenso de primer paso en el hígado

Gastrointestinales: No se tiene registro

Casos reportados post-comercialización: No se tiene registro³⁷

Precauciones: A la fecha no se han reportado casos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis ni sobre la fertilidad.³⁹

Advertencias: El dextrometorfano puede producir elevación de la amilasa sérica y transaminasa.³⁹

Tratamiento en caso de sobredosis: Se ha reportado excitación más que sedación. El antídoto específico naloxona, se ha utilizado para tratar la sobredosificación con dextrometorfano.³⁹

Vía de administración: es oral, para mayores de 12 años: se debe tomar una cápsula cada 12 horas y en adultos: 1 ó 2 cápsulas cada 12 horas.³⁹

3. Metilparabeno

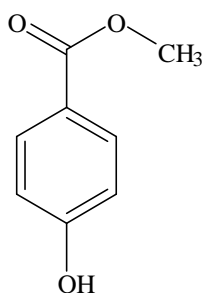


Figura 11. Estructura química metilparabeno

Nombre científico:	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico metil éster
Sinónimos:	Metil <i>p</i> -hidroxibenzoato, <i>p</i> -hidroxibenzoato de metilo, Nipagin, Tegostep, Metil quimosept, Metil parasept
Fórmula condensada:	C ₈ H ₈ O ₃
Peso molecular:	152.15 g/mol
CAS:	99-76-3
T_{fus}:	127° C

Descripción: Sólido en forma de cristales sin color o polvo cristalino blanco, de color débil característico, sabor ligeramente ardiente.^{43,44}

Solubilidad: 1 g en 400 mL de agua, 1 en 3 de alcohol etílico, 1 en 10 de éter libremente soluble en metanol, benceno y tetracloruro de carbono.⁴⁰

Coefficiente de partición⁴⁵:	Aceite de almendras	7.5
	Aceite de ricino	6.0
	Aceite de maíz	4.1
	Adipato de dietilo	200
	Miristato de isopropilo	18.0
	Lanolina	7.0
	Aceite mineral	0.1
	Aceite de cacahuete	4.2
	Aceite de soja	6.1

Aplicaciones: El metilparabeno es ampliamente utilizado como un conservador antimicrobiano en cosméticos, alimentos y formulaciones

farmacéuticas que pueden ser utilizados en forma exclusiva, en combinación con los parabenos o con otros agentes antimicrobianos, en cosméticos el metilparabeno es el más frecuentemente utilizado como conservador antimicrobiano.⁴¹

Los parabenos son eficaces en un amplio rango de pH y tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, aunque son más eficaces contra levaduras y mohos. La actividad de los antimicrobianos aumenta conforme a la longitud de la cadena de la alquilo, sin embargo, disminuye la solubilidad acuosa. Una mezcla de parabenos es, pues, con frecuencia la apertura de la preservación eficaz. La eficacia de conservantes también se mejora mediante la adición de 2-5% de propilenglicol o mediante el uso de parabenos en combinación con otros agentes antimicrobianos, como imidurea. Debido a la baja solubilidad de los parabenos, sus sales son frecuentemente usadas en formulaciones, sin embargo esto puede causar que el pH de las formulaciones mal tamponadas tiendan a ser más alcalinas.⁴¹

Mecanismo de acción: Metilparabeno presenta actividad antimicrobiana entre pH 4-8. La eficacia de conservación disminuye con el aumento del pH. Debido a la formulación, los parabenos anión sulfato son más activos contra las levaduras y los mohos que contra las bacterias. Ellos también son más activos contra las bacterias gram positivas que contra bacterias gram negativas.⁴¹

Metilparabeno es el menos efectivo de los parabenos, la actividad de los antimicrobianos aumenta con la longitud de la cadena, cada vez mayor de la mitad de álcali. La actividad puede ser mejorada mediante el uso de combinaciones de parabenos, ya que producen efectos aditivos. Por lo tanto, combinaciones de metilo, etilo,

propilo y butilparabeno, se utilizan a menudo juntos. De la actividad también se ha informado de que mejora con la adición de otros excipientes tales como: propilenglicol 2-5% feniletilo alcohol y el ácido EDTA. La actividad también puede ser mejorada, debido a los efectos de sinergia mediante el uso de combinaciones de parabenos con otros conservantes antimicrobianos, como imidurea.⁴¹

El producto de la hidrólisis, el ácido *p*-hidroxibenzoico, prácticamente no tiene actividad antimicrobiana.⁴¹

Estabilidad y condiciones de almacenamiento: Las soluciones acuosas de metilparabeno a pH 3-6, se puede esterilizar en autoclave a 120 ° C durante 20 minutos, sin descomposición soluciones acuosas con un pH de 3 a 6 es estable (menos del 10% de descomposición) durante cerca de cuatro años a temperatura ambiente en solución acuosa mientras que a las de pH 8 están sujetas a hidrólisis rápida (10% o más) en alrededor de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente.⁴¹

Reacciones adversas: No se han reportado, sin embargo puede asociarse con reacciones de hipersensibilidad.⁴¹

Vía de administración: Metilparabeno (0,18%), junto con propilparabeno (0,02) se ha utilizado para la preservación de las diversas formulaciones parenterales farmacéuticas en las siguientes concentraciones.⁴¹

Forma farmacéutica	Concentración %
Inyecciones IM, IV, SC	0.065 -0.25
Oftálmicos	0.015-0.05
Soluciones orales y suspensiones	0.015-0.2

4. Propilparabeno

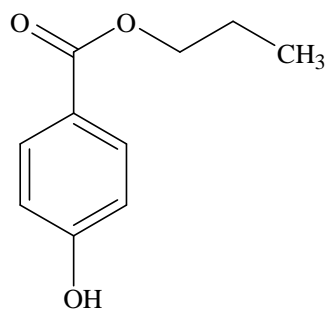


Figura 12. Estructura química Propilparabeno

Nombre científico: *p*-hidroxibenzoato de propilo

Sinónimos: Nipasol, Tegosept *p*, Protaben, Propil ester del ácido 4-hidroxibenzoico, Propil ester del ácido *p*-hidroxibenzoico, Paseptol, Parasept, Aseptofom P, Betacide P, Bonomold OP, Aseptofom de Propilo, *p*-oxibenzoato de propilo.

Fórmula condensada: C₁₀H₁₂O₃

Peso molecular: 180.20 g/mol

CAS: 94-13-3

T_{fus}: 95-98° C

Descripción: Cristales incoloros o polvo blanco, polvo sin olor ni sabor.^{46, 41}

Solubilidad: 1 g en 2500 mL de agua, 1 en 400 de agua hirviendo, 1 en 1.5 de alcohol y 1 en 3 de éter y fácilmente soluble en metanol.^{41, 43, 47}

Coefficiente de partición ⁴⁴ : Aceite de maíz	58.0
Aceite mineral	0.5
Aceite de cacahuete	51.8
Aceite de soja	65.9

Aplicaciones: El propilparabeno es ampliamente utilizado como un conservador antimicrobiano en cosméticos, alimentos y formulaciones farmacéuticas que se pueden utilizar ya sea solo, en combinación con otros ésteres de parabenos, o con otros agentes antimicrobianos. En los cosméticos es el segundo conservador más utilizado.⁴¹

Los parabenos son eficaces en un amplio rango de pH y tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, aunque son más eficaces contra levaduras y mohos.⁴¹

Debido a la baja solubilidad de los parabenos, en particular las sales de los parabenos son utilizadas con frecuencia en las formulaciones. Sin embargo, esto puede causar que el pH de las formulaciones mal tamponadas sean más alcalinas.⁴¹

Mecanismo de acción: Propilparabeno presenta actividad antimicrobiana entre pH 4-8. La eficacia de conservadores disminuye con el aumento de pH debido a la formulación, los parabenos anión sulfito son más activos contra la levadura y los mohos que contra las bacterias. Ellos también son más activos contra las bacterias gram positivas que contra bacterias gram negativas.⁴¹

La actividad de los parabenos aumenta con la longitud de la cadena cada vez mayor de la fracción alcalina; sin embargo, disminuye la solubilidad.⁴¹

La actividad puede ser mejorada mediante el uso de combinaciones de parabenos ya que producen efectos aditivos. Así propilparabeno ha sido utilizado con metilparabeno en la preparación parenteral y se utiliza con combinaciones de parabenos otras formulaciones tópicas y orales. También se ha informado que la actividad mejora con la adición de otros excipientes.⁴¹

Estabilidad y condiciones de almacenamiento: Soluciones acuosas de propilparabeno a pH 3-6, se puede esterilizar en autoclave, sin descomposición. A

pH 3-6 solución acuosa es estable (menos del 10% de descomposición) durante cerca de cuatro años a temperatura ambiente, Una solución acuosa al mismo tiempo a un pH de 8 o superior están sujetos a la hidrólisis rápida (10% o más después de unos 60 días de almacenamiento en temperatura ambiente).⁴¹

Reacciones adversas: No se han reportado, sin embargo puede asociarse con reacciones de hipersensibilidad.⁴¹

Vía de administración: Propilparabeno (0,02%), junto con metilparabeno (0,18%) ha sido utilizado para la preservación de las diversas formulaciones parenterales farmacéuticas.⁴¹

Forma farmacéutica	Concentración %
Inyecciones IM, IV, SC	0.005 -0,2
Oftálmicos	0.005-0.01
Soluciones orales y suspensiones	0.01-0.02
Las preparaciones tópicas	0.01-0.06
Preparados dentro de la vagina	0.02-0.1

III. PROBLEMA RESUELTO

En la vida cotidiana del departamento de control de calidad en laboratorios **Grossman** se analizan todo tipo de materias primas, productos a granel y productos terminados realizando pruebas fisicoquímicas y valoraciones de estas, la mayoría por HPLC. Sin embargo aunque se cuenta con químicos especializados en el manejo de estos equipos, no siempre resulta una práctica tan rápida como uno esperaría. Si bien es cierto que la HPLC es una técnica que permite separar y cuantificar una sustancia específica dentro de una mezcla de compuestos, en la actualidad esto no es suficiente debido a la demanda del mercado que exige la fabricación y liberación de productos de una forma más rápida día con día, es por eso que en el departamento de desarrollo analítico de **Grossman** se realiza el desarrollo y validación de métodos analíticos por UPLC.

La importancia de este desarrollo es que permite reducir una corrida cromatográfica tradicional por HPLC para el análisis de guaifenesina, dextrometorfano, metilparabeno y propilparabeno de 35 minutos a una décima parte de este tiempo por UPLC (3.5 minutos). Lo cual es de suma importancia en la emisión de resultados para continuar con siguiente etapa de fabricación (acondicionamiento) evitando el uso innecesario de los equipos utilizados para contener el granel mismo que puede ser utilizado para otra fabricación en ese periodo de espera. Generalmente los resultados son entregados un día después de la recepción del granel y con este método es posible entregar resultados en unas cuantas horas el mismo día.

Aunado a esto, también resulta de gran importancia mencionar que el gasto de reactivos y solventes es mínimo debido a la velocidad de flujo y la duración de la corrida cromatográfica.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Demostrar experimentalmente que el uso del Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) reduce los costos y tiempos de análisis en la determinación de dextrometorfano, guaifenesina, metilparabeno y propilparabeno en un jarabe expectorante, comparado con el método usado actualmente por HPLC.

Objetivos Particulares

- ✓ Desarrollar el método para la determinación de dextrometorfano, guaifenesina, metilparabeno y propilparabeno en un jarabe expectorante por UPLC.
- ✓ Realizar la validación del método desarrollado.
- ✓ Comparar los tiempos de análisis y los resultados de validación entre UPLC-HPLC.
- ✓ Determinar las ventajas y desventajas de ambas metodologías.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

Experimental, prospectivo, longitudinal.

Población

Muestras de jarabe expectorante como producto terminado o granel.

Criterios de Inclusión

Todos los lotes de fabricación del jarabe expectorante que contengan Dextrometorfano, Guaifenesina, Metilparabeno y Propilparabeno.

Criterios de exclusión

Cualquier jarabe no perteneciente a la formulación.

Criterios de eliminación

Muestras que no cumplan con las especificaciones físicas del producto.

Variables dependientes

Tiempos de retención de los analitos

Altura de los picos cromatográficos

Áreas de respuesta de los analitos

Concentraciones finales obtenidas

Tiempos de retención de los analitos

Variables independientes

Equipo de cromatografía de HPLC a UPLC

Velocidad de flujo de la fase móvil

Tamaño de partícula de la fase estacionaria de 5 μm a 1.7 μm

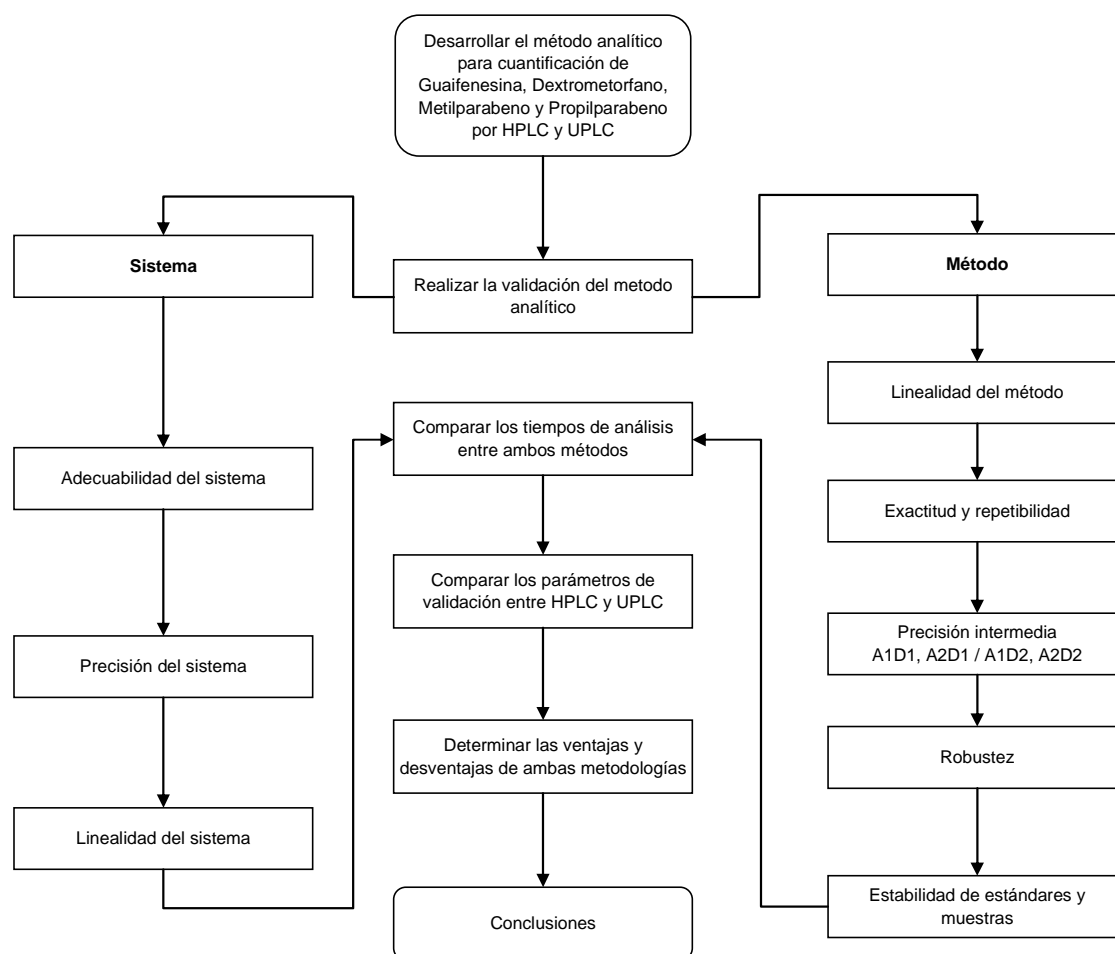
Longitud y diámetro interno de la columna

Composición de la fase móvil

Presión del sistema

VI. METODOLOGÍA

A. Diagrama de Flujo



B. Método Analítico

1. Material y equipo

Materiales y equipos	HPLC	UPLC
Material de vidrio perfectamente limpio y seco	Si	Si
Balanza analítica calibrada	Si	Si
Sistema de microfiltración: Membrana de nylon de 47 mm, 0.45 µm tamaño de poro Acrodiscos nylon 25 mm, 0.45 µm tamaño de poro	Si	Si
Columna XTerra RP-8 4.6 mm x 150 mm, 5.0 µm	Si	No
Columna Acquity BECH 50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm	No	Si
Cromatógrafo de líquidos Waters HPLC con: Bomba binaria Automuestreador Waters UPLC Detector de arreglo de diodos Acquity UPLC Monitor Dell Optiplex GX270 Impresora Hewlett Packard Laser Jet 5200 PCL6 Procesador Dell Optiplex	Si	No
Cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC con: Bomba binaria Acquity UPLC Automuestreador Waters UPLC Detector de arreglo de diodos Acquity UPLC Monitor Dell Optiplex GX270 Impresora Hewlett Packard Laser Jet 5200 PCL6 Procesador Dell Optiplex	No	Si

Tabla 1. Lista de materiales y equipos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico

2. Reactivos

Reactivos y estándares	HPLC	UPLC
Agua grado HPLC	Si	Si
Metanol grado HPLC	Si	Si
Acetonitrilo grado HPLC	No	Si
Ácido fosfórico R.A. JT Baker	Si	Si
Fosfato de sodio monobásico R.A. JT Baker	Si	Si
Fosfato de potasio monobásico R.A. JT Baker	No	Si
Guaifenesina sustancia de referencia	Si	Si
Bromhidrato de Dextrometorfano sustancia de referencia	Si	Si
Metilparabeno sustancia de referencia	Si	Si
Propilparabeno sustancia de referencia	Si	Si

Tabla 2. Lista de estándares y reactivos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico

3. Preparación de fases móviles y diluentes

Preparación de la solución 10 mM de fosfato de sodio monobásico pH 3.0

Pesar 1.37 g de fosfato de sodio monobásico y transferirlos a un matraz de 1000 mL, disolver y llevar a volumen con agua grado HPLC, ajustar el pH a 3.00 ± 0.05 con solución de ácido fosfórico al 10 %. Filtrar a través de membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, desgasificar con agitación y vacío por 5 minutos.

Preparación de la solución 5 mM de fosfato de potasio monobásico pH 3.0

Pesar 0.3402 g de fosfato de potasio monobásico y transferirlos a un matraz de 500 mL, disolver y llevar a volumen con agua grado HPLC, ajustar el pH a 3.00 ± 0.05 con solución de ácido fosfórico al 10 %. Filtrar a través de membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, desgasificar con agitación y vacío por 5 minutos.

Preparación de acetonitrilo HPLC

Filtrar acetonitrilo grado HPLC por membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, desgasificar con agitación y vacío por 5 minutos.

Preparación de metanol HPLC

Filtrar metanol grado HPLC por membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, desgasificar con agitación y vacío por 5 minutos.

Preparación de solución de dilución

Mezclar 500 mL de agua grado HPLC con 500 mL de Metanol grado HPLC

4. Preparación de soluciones de referencia y muestras para HPLC

Preparación de la solución de referencia de bromhidrato de dextrometorfano (Solución A)

Pesar con exactitud y aproximadamente 30 mg de bromhidrato de dextrometorfano sustancia de referencia y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL, adicionar 10 mL de la solución de dilución y sonicar durante 5 minutos. Llevar a volumen con la solución de dilución y mezclar. Preparar la solución por duplicado.

Preparación de la solución de referencia de metilparabeno (solución B)

Pesar con exactitud aproximadamente 38.3 mg de metilparabeno sustancia de referencia y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de la solución de dilución y sonicar durante 5 minutos. Llevar a volumen con la solución de dilución y mezclar. Preparar la solución por duplicado.

Preparación de la solución de referencia de propilparabeno (solución C)

Pesar con exactitud aproximadamente 16.9 mg de propilparabeno sustancia de referencia y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de la solución de dilución y sonicar durante 5 minutos. Llevar a volumen con la solución de dilución y mezclar. Preparar la solución por duplicado.

Preparación de la solución de referencia de guaifenesina + A + B + C

Pesar con exactitud 60 mg de guaifenesina sustancia de referencia y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 15 mL de la solución de dilución y sonicar durante 5 minutos, adicionar una alícuota de 5 mL de la solución A, 10 mL de la solución B y 4 mL de la solución C. Llevar a volumen con la solución de dilución y mezclar. Filtrar por acrodisco de nylon de 25 mm, 0.45 µm tamaño de poro. Preparar la solución por duplicado.

Concentración aproximada: guaifenesina 1200.0 µg/mL, bromhidrato de dextrometorfano 120.0 µg/mL, propilparabeno 102.0 µg/mL y propilparabeno 18.0 µg/mL ver figura 13.

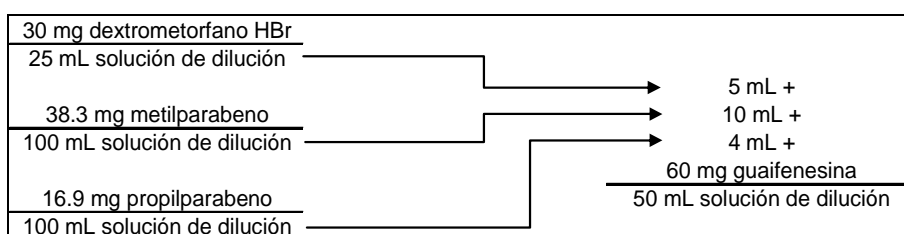


Figura 13. Preparación de las soluciones de referencia para HPLC

Preparación de la solución muestra

Homogeneizar el contenido de 2 frascos BRE-A-COL jarabe infantil. Tomar una alícuota de 6 mL, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de solución de dilución, mezclar y llevar a volumen con solución de dilución. Mezclar y filtrar por acrodisco de nylon de 25 mm, 0.45 µm, de tamaño de poro. Preparar la solución por duplicado.

Concentración aproximada: guaifenesina 1200.0 µg/mL, bromhidrato de dextrometorfano 120.0 µg/mL, metilparabeno 102.0 µg/mL y propilparabeno 18.0 µg/mL ver figura 14.

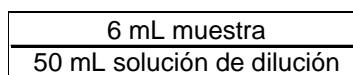


Figura 14. Preparación de las soluciones muestra para HPLC

Estabilidad de las soluciones

Las soluciones muestras y patrón de referencia listas para su análisis son estables durante 24 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz.

5. Preparación de soluciones de referencia y muestras para UPLC

Preparación de la solución de referencia de propilparabeno (solución A)

Pesar con exactitud aproximadamente 22.5 mg en base seca de propilparabeno sustancia de referencia; transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 40 mL de solución de dilución, sonicar 5 minutos, dejar enfriar, aforar con solución de dilución y agitar. Preparar la solución por duplicado.

Preparación de la solución de referencia de guaifenesina, dextrometorfano HBr y metilparabeno (solución B)

Pesar con exactitud el equivalente a 150.0 mg en base seca de guaifenesina sustancia de referencia, 15.0 mg en base seca de bromhidrato de dextrometorfano sustancia de referencia y 12.8 mg de metilparabeno sustancia de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 80 mL de solución de dilución y 5 mL de la solución A, sonicar 5 minutos, dejar enfriar, aforar, con solución de dilución y agitar. Preparar la solución por duplicado.

Preparación de la solución patrón de referencia guaifenesina, dextrometorfano HBr metilparabeno y propilparabeno (Solución C)

Transferir 4 mL de la solución B a un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con solución de dilución y agitar. Filtrar por acrodisco de nylon de 25 mm de diámetro 45 μ m tamaño de poro. Preparar la solución por duplicado.

Concentración aproximada guaifenesina 120 μ g/mL, bromhidrato de dextrometorfano 12.0 μ g/mL, metilparabeno 10.2 μ g/mL y propilparabeno 1.8 μ g/mL ver figura 15.

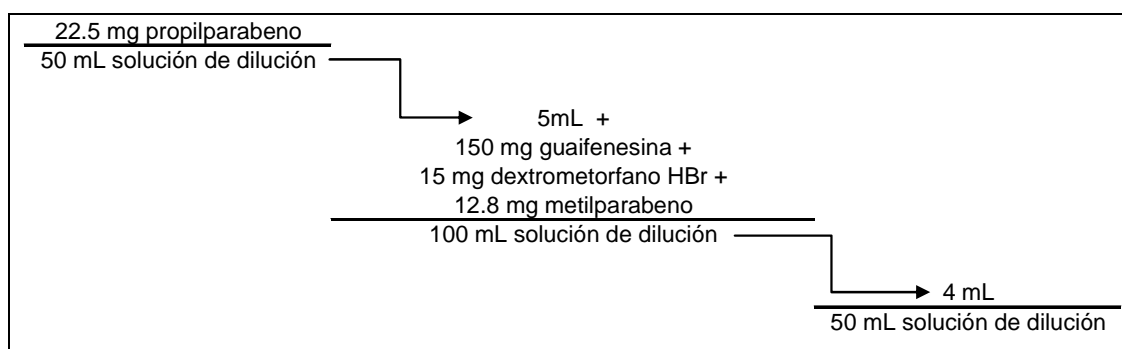


Figura 15. Preparación de las soluciones de referencia para HPLC

Preparación de la muestra

Mezclar el contenido de dos frascos de BRE-A-COL Jarabe Infantil y transferir una alícuota de 5.0 mL a un matraz de 50 mL, adicionar 40 mL de solución de dilución, mezclar y llevar a volumen con solución de dilución, mezclar y transferir una alícuota de 3 mL a un matraz de 25 mL, aforar con solución de dilución, mezclar y filtrar por Acrodisco Nylon 25 mm, 0.45 µm tamaño de poro. Preparar la solución por duplicado concentración aproximada guaifenesina 120 µg/mL, bromhidrato de dextrometorfano 12.0 µg/mL, metilparabeno 10.2 µg/mL y propilparabeno 1.8 µg/mL ver figura 16.

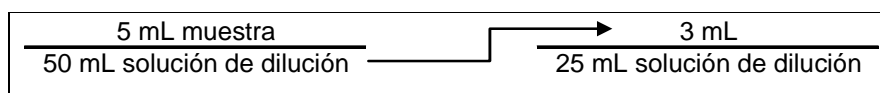


Figura 16. Preparación de las soluciones muestra para HPLC

Estabilidad de las soluciones

Las soluciones muestras y patrón de referencia listas para su análisis son estables durante 24 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz.

6. Procedimiento

Condición	HPLC	UPLC
Columna	XTerra, RP8, 5µm, 4.6 X 150 mm DI	Acquity BECH, C18 1.7µm, 2.1 x 50 mm DI
Fase móvil (gradiente)	NaH ₂ PO ₄ 10 mM, pH 3.0 : MeOH ver tabla 4	KH ₂ PO ₄ 10 mM, pH 3.0 : ACN ver tabla 5
Velocidad de flujo	1.0 mL/min	0.35 mL/min
Volumen de inyección	10 µL	5 µL
Longitud de onda	219 nm para dextrometorfano HBr 254 nm para guaifenesina, Metilparabeno y Propilparabeno	219 nm para dextrometorfano HBr 254 nm para guaifenesina, Metilparabeno y Propilparabeno
Temperatura muestras	ambiente	20 °C
Temperatura columna	ambiente	45 °C

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para HPLC y UPLC

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% NaH ₂ PO ₄ 10 mM, pH3.0	% MeOH	Curva
0.00	1.0	70	30	6
3.00	1.0	70	30	6
13.00	1.0	40	60	6
20.00	1.0	40	60	6
23.00	1.0	70	30	6
35.00	1.0	70	30	6

Tabla 4. Gradiente por HPLC

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% KH ₂ PO ₄ 10 mM, pH3.0	% ACN	Curva
0.00	0.35	25	75	6
0.70	0.35	25	75	6
0.90	0.35	40	60	6
2.40	0.35	40	60	6
2.80	0.35	25	75	6
3.50	0.35	25	75	6

Tabla 5. Gradiente por UPLC

Acondicionamiento del sistema cromatográfico

Acondicionar el sistema cromatográfico durante 15 minutos o más hasta tener una línea base y temperatura de la columna estable. Inyectar 4 veces la solución patrón de referencia "1" y calcular el C. V. de la respuesta el cual no debe ser mayor al 2.0%.

Adecuabilidad del sistema cromatográfico

Inyectar 2 veces la solución patrón de referencia "2". Calcular el factor de recobro para la solución patrón de referencia 1 el cual debe estar entre 98.0 y 102.0%. Si el parámetro anterior no cumple, preparar una 3ª solución patrón de referencia, inyectar y recalcular. Cumplir con los parámetros de adecuabilidad establecidos.

Injectar las muestras, intercalando las soluciones patrón de referencia "1" después de un número apropiado de muestras (no más de seis). Terminar la corrida con la solución de referencia "1".

7. Parámetros cromatográficos

	guaifenesina	dextrometorfano Bromhidrato	metilparabeno	propilparabeno
Tiempo de retención (min)	≈5.1	≈11.0	≈12.9	≈19.8
Factor de coleo ≤ 2.0	≈1.1	≈1.4	≈1.1	≈1.1
Eficiencia ≤ 2500	≈4355	≈6299	≈16428	≈80610
Resolución ≥ 1.5	N/A	≈N/A	≈22.3	≈20.4
Factor de capacidad ≥ 2.0	≈9.2	≈21.0	≈24.9	≈38.7
Tiempo total de corrida 35 minutos				

Tabla 6. Parámetros cromatográficos esperados en adecuabilidad del sistema por HPLC

	guaifenesina	dextrometorfano Bromhidrato	metilparabeno	propilparabeno
Tiempo de retención (min)	≈0.7	≈1.4	≈1.1	≈1.9
Factor de coleo ≤ 2.0	≈1.3	≈1.3	≈1.1	≈1.0
Eficiencia ≤ 2500	≈35000	≈2900	≈3600	≈17000
Resolución ≥ 1.5	≈N/A	≈N/A	≈14.1	≈17.7
Factor de capacidad ≥ 2.0	≈1.4	≈3.8	≈2.8	≈5.6
Tiempo total de corrida 3.5 minutos				

Tabla 7. Parámetros cromatográficos esperados en adecuabilidad del sistema por UPLC

8. Cálculos

a) Cálculos para el sistema HPLC

$$\text{g de guaifenesina / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times \text{FVstd} \times 50 \times 100}{\text{Astd} \times 50 \times 6 \times 1000} \quad (12)$$

$$\text{mg de dextrometorfano HBr / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times \text{FVstd} \times 5 \times 50 \times 100}{\text{Astd} \times 50 \times 6 \times 1000} \quad (13)$$

$$\text{mg de metilparabeno / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times \text{FVstd} \times 10 \times 50 \times 100}{\text{Astd} \times 100 \times 50 \times 6} \quad (14)$$

$$\text{mg de propilparabeno / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times \text{FVstd} \times 4 \times 50 \times 100}{\text{Astd} \times 100 \times 50 \times 6} \quad (15)$$

b) Cálculos para el sistema UPLC

$$\text{g de guaifenesina / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times 4 \times \text{FVstd} \times 50 \times 25 \times 100}{\text{Astd} \times 100 \times 50 \times 5 \times 3 \times 1000} \quad (16)$$

$$\text{mg de dextrometorfano HBr / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times 4 \times \text{FVstd} \times 50 \times 25 \times 100}{\text{Astd} \times 100 \times 50 \times 5 \times 3} \quad (17)$$

$$\text{mg de metilparabeno / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times 4 \times \text{FVstd} \times 50 \times 25 \times 100}{\text{Astd} \times 100 \times 50 \times 5 \times 3} \quad (18)$$

$$\text{mg de propilparabeno / 100 mL} = \frac{\text{Am} \times \text{Pstd} \times 25 \times 4 \times \text{FVstd} \times 50 \times 25 \times 100}{\text{Astd} \times 50 \times 100 \times 50 \times 5 \times 3} \quad (19)$$

Donde:

Am= Área de la solución de la muestra

Astd = Área promedio de la solución de referencia

Pstd= Peso de la sustancia de referencia en mg

FVstd= Factor de valoración de la sustancia de referencia

9. Validación del método analítico

Adecuabilidad del sistema

Para cada sistema inyectar por quintuplicado la solución de referencia 1, reportando para cada analito el CV y cuando proceda k', N, R, T, y tr.

Linealidad del sistema

Para cada sistema preparar por triplicado los siguientes niveles de concentración 50%, 75%, 100% 125% y 150% de la solución de referencia a partir de una misma solución concentrada para los cuatro analitos.

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

IC(β_1) no debe incluir el cero

Cualquier otro criterio de aceptación debe ser justificado

Precisión del sistema

Preparar una muestra del nivel 100% para cada sistema e inyectarla por sextuplicado.

Criterios de aceptación:

$$CV \leq 1.5 \%$$

Linealidad del método

Para cada sistema preparar por triplicado los siguientes niveles de concentración 50%, 75%, 100% 125% y 150% adicionando la cantidad de placebo cargado a cada muestra manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en todos los niveles.

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

IC(β_1) debe incluir la unidad

IC(β_0) debe incluir el cero

El CV y/x del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2.0%

Exactitud y repetibilidad

Preparar para cada sistema seis muestras con placebos cargados del nivel 100% inyectar cada muestra individualmente.

Criterios de aceptación:

CV \leq 1.5 %

Precisión intermedia /analista

Para cada sistema analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizando la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos. Reportar el contenido/ de cada analito de todas las muestras.

Criterios de aceptación:

CV \leq 2.0 %

Valores superiores deben ser justificados

Robustez del sistema

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que contenga un nivel cercano o igual al 100% variando en la composición de la fase móvil acuosa el pH de 3.0 a 2.8 y 3.2 (condiciones normal, 1 y 2 respectivamente).

Criterios de aceptación:

$|d_i| \leq 2.0$

Estabilidad analítica de la muestra

Para cada sistema analizar por triplicado una muestra independiente. Simultáneamente y de la misma muestra procesar un duplicado y guardarla a temperatura ambiente protegida de la luz durante 24 horas. Proseguir el análisis al término de las condiciones de almacenaje, utilizando una solución de referencia nueva. Reportar la valoración de cada analito de cada preparación.

Criterios de aceptación:

$|d_i| \leq 2.0$

VII. RESULTADOS

Parámetro	Criterio de aceptación	guaifenesina		dextrometorfano HBr		metilparabeno		propilparabeno	
		HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
CV	≤ 2.0 %	0.1	0.4	0.2	0.3	0.1	0.3	0.1	0.4
k'	≥ 2.0	9.2	1.2	20.9	3.7	25.0	2.8	38.7	5.6
R	≥ 1.5	N/A	N/A	N/A	5.5	22.2	7.8	20.0	12.4
T	≤ 2.0	1.1	1.4	1.3	1.4	1.1	1.2	1.1	1.1
tr(min)	N/A	5.1	0.7	10.9	1.4	13.0	1.10	19.9	2.0
N	N/A	4274	3532	6115	34470	16320	3640	77435	16952

Tabla 8. Adecuabilidad del sistema para Guaifenesina, Dextrometorfano HBr, Metilparabeno y Propilparabeno para linealidad del sistema entre HPLC vs UPLC.

	guaifenesina		dextrometorfano HBr		metilparabeno		propilparabeno	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
Nivel	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
50	611.37	60.14	59.58	6.03	25.65	5.12	4.58	0.90
75	917.05	90.22	89.36	9.05	51.29	7.68	9.16	1.35
100	1222.73	120.29	119.15	12.07	76.94	10.23	13.74	1.80
125	1528.42	150.36	148.94	15.09	102.58	12.79	18.32	2.25
150	1834.10	180.43	178.73	18.10	153.87	15.35	27.48	2.70

Tabla 9. Concentraciones de guaifenesina, dextrometorfano HBr, metilparabeno y propilparabeno para linealidad del sistema entre HPLC vs UPLC.

Parámetro	Criterio aceptación	guaifenesina		dextrometorfano HBr		metilparabeno		propilparabeno	
		HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
r ²	0.9800	0.9999	0.9999	0.9997	0.9998	0.9999	0.9997	0.9999	0.9998
CV	1.5 %	0.4	1.4	1.3	0.8	0.9	0.9	1.0	1.1
IC(m),	no incluye el cero	1533.94, 1547.54	2056.13, 2083.13	11578.98, 1825.46	16480.03, 6763.62	57017.75, 57575.61	78589.44, 80093.92	49012.46, 49547.07	67805.62, 68940.16
N	mínimo 15	15	15	15	15	15	15	15	15
M	N/A	1540.74	2069.63	11702.22	16621.83	57296.6811	79341.68	49279.77	68372.89
B	N/A	3118.42	7591.31	14981.69	-2610.66	16323.6391	-12047.80	2958.09	-2914.87

Tabla 10. Resultados de linealidad del sistema para guaifenesina, dextrometorfano HBr, metilparabeno y propilparabeno para linealidad del sistema entre HPLC vs UPLC.

Analito	HPLC	UPLC
guaifenesina	0.1	0.3
dextrometorfano	0.2	0.3
metilparabeno	0.1	0.3
propilparabeno	0.1	0.3

Tabla 11. Resultados de Precisión del sistema para guaifenesina, dextrometorfano HBr, metilparabeno y propilparabeno entre HPLC vs UPLC

Parámetro	Criterio aceptación	guaifenesina		dextrometorfano HBr		metilparabeno		propilparabeno	
		HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
Promedio de % recuperado	98.0 – 102.0%	99.1	100.9	98.7	101.2	101.2	101.1	101.8	100.0
CV	≤ 2.0 %	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.5	0.0
IC (μ)	el promedio aritmético debe incluirse en el intervalo	99.0, 99.2	100.6, 101.2	98.5 , 98.9	101.0 , 101.4	101.0 , 101.4	100.8 , 101.4	101.3, 102.3	100.0 , 100.0

Tabla 12. Exactitud y repetibilidad del método al 100 % para guaifenesina, dextrometorfano HBr, metilparabeno y propilparabeno entre HPLC vs UPLC

Nivel (%)	Criterio aceptación	guaifenesina		dextrometorfano HBr		metilparabeno		propilparabeno	
		HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
50	98.0-102.0 % CV ≤2.0%	100.1 0.2	101.1 0.6	98.8 0.8	99.9 0.2	98.5 0.8	100.6 0.2	100.0 0.0	100.0 0.0
75	98.0-102.0 % CV ≤2.0%	99.5 1.0	101.1 0.3	99.7 0.9	100.9 0.3	99.14 0.8	100.9 0.0	100.7 1.2	100.0 0.0
100	98.0-102.0 % CV ≤2.0%	99.0 0.2	100.7 0.5	99.0 0.2	101.1 0.3	99.4 0.3	101.2 0.2	100.0 0.0	100.0 0.0
125	98.0-102.0 % CV ≤2.0%	99.4 0.1	99.8 0.4	99.6 0.1	99.4 0.4	99.7 0.1	100.1 0.4	101.1 0.0	99.0 0.0
150	98.0-102.0 % CV ≤2.0%	99.2 0.2	99.4 0.3	100.2 0.3	99.7 0.3	99.4 0.3	100.3 0.3	99.8 1.5	99.4 0.5

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de Guaifenesina, Bromhidrato de Dextrometorfano, Metilparabeno y Propilparabeno en linealidad del método entre HPLC vs UPLC

Parámetro	Criterio aceptación	guaifenesina		dextrometorfano HBr		metilparabeno		propilparabeno	
		HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
r^2	≥ 0.9800	0.9999	0.9998	0.9998	0.9996	1.0000	0.9998	0.9995	0.9998
m	≈ 1.0000	0.9883	0.9842	1.0063	0.9907	0.9962	0.9988	0.9984	0.9878
b	≈ 0.0000	0.3152	0.8874	-0.612	0.0506	-0.0100	0.0286	0.032	0.006
\bar{x}	98.0 - 102.0%	99.4	100.4	99.5	100.2	99.2	100.6	100.3	99.7
CV	≤ 2.0 %	0.6	0.8	0.7	0.7	0.6	0.5	0.9	0.5

Tabla 14. Resultados de linealidad del método para de guaifenesina, dextrometorfano HBr, metilparabeno y propilparabeno HPLC vs UPLC

	guaifenesina				dextrometorfano HBr				metilparabeno				propilparabeno			
	HPLC		UPLC		HPLC		UPLC		HPLC		UPLC		HPLC		UPLC	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Día 1	102.3 102.3 102.8	100.5 102.8 101.3	104.2 103.5 102.6	104.1 104.9 102.5	104.0 103.9 104.6	101.8 104.0 102.5	102.6 101.8 101.1	101.0 101.0 99.7	97.1 97.1 97.1	96.3 98.3 96.9	102.1 101.3 100.4	101.4 102.6 100.1	103.7 103.1 103.8	101.7 103.7 102.4	101.5 100.9 99.9	101.5 100.9 99.9
Día 2	102.0 102.1 102.1	100.6 101.4 101.6	104.1 102.4 102.9	102.7 100.6 102.3	103.3 103.7 103.8	101.9 102.6 103.1	99.6 99.6 98.4	100.3 97.7 99.7	97.4 97.8 98.0	95.4 95.9 96.3	100.9 99.7 99.6	99.8 98.1 99.6	104.6 107.1 106.7	102.5 103.4 103.2	101.5 100.5 100.5	99.7 98.1 99.6
\bar{x} Analista = CV día=	102.3 0.3	101.4 0.8	103.3 0.7	102.9 1.5	103.9 0.4	102.7 0.8	100.5 1.6	99.9 1.2	97.5 0.4	96.5 1.0	100.7 1.0	100.3 1.6	104.8 1.6	102.8 0.7	100.8 0.6	100.0 1.26
\bar{x} Global= CV ₁₂ =	101.8 0.7		103.1 1.1		103.3 0.9		100.2 1.4		97.0 0.9		100.5 1.2		103.8 1.6		100.4 1.0	
Especificaciones:	CV por día / analista ≤ 2.0 % CV del total del análisis (cuando menos 12) ≤ 2.0%															

Tabla 15. Precisión intermedia para Guaifenesina, Dextrometorfano HBr, Metilparabeno y Propilparabeno 2 sistemas, 2 analistas 2 días.

	guaifenesina				dextrometorfano HBr				metilparabeno				propilparabeno			
	HPLC				HPLC				HPLC				HPLC			
	muestras		Estándares		muestras		Estándares		muestras		Estándares		muestras		Estándares	
	inicial	Final	Inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	102.0	102.7	100.1	100.5	103.3	104.7	100.4	101.2	97.4	97.6	100.1	99.4	104.6	105.5	101.9	101.7
2	102.1	102.7	100.2	100.3	103.7	104.7	99.4	100.2	97.8	97.5	100.3	99.9	107.1	105.5	99.9	99.8
3	102.1	102.9			103.8	104.8			98.0	97.8			106.7	105.8		
\bar{x} = CV=	102.1 0.1	102.8 0.1	100.2 0.1	100.4 0.1	103.6 0.3	104.7 0.1	99.9 0.7	100.7 0.7	97.3 0.3	97.6 0.2	100.2 0.1	99.7 0.4	106.1 1.3	105.6 0.2	100.9 1.4	100.8 1.3
di	0.7		0.2		1.1		0.8		0.1		0.5		0.5		0.1	

Tabla 16. Estabilidad analítica de las muestras para guaifenesina, dextrometorfano HBr, metilparabeno y propilparabeno.

	guaifenesina				dextrometorfano HBr				metilparabeno				propilparabeno			
	HPLC				HPLC				HPLC				HPLC			
	muestras		Estándares		muestras		Estándares		muestras		Estándares		muestras		Estándares	
	inicial	Final	Inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	103.5	103.3	99.9	100.4	102.0	100.8	100.4	100.4	100.7	100.4	99.7	100.2	101.2	99.2	99.3	98.9
2	103.8	103.7	100.5	100.1	102.2	101.4	100.7	100.2	100.8	100.5	100.2	99.9	101.1	99.1	100.1	98.1
3	103.5	103.4			101.7	101.3			100.7	101.0			101.0	99.8		
\bar{x} = CV=	103.6 0.2	103.5 0.2	100.2 0.4	100.3 0.2	102.2 0.2	101.2 0.3	100.6 0.2	100.3 0.1	100.7 0.1	100.6 0.3	100.0 0.4	100.1 0.2	101.1 0.1	99.4 0.4	99.7 0.8	98.5 0.6
di	0.1		0.1		0.8		0.3		0.1		0.1		1.7		1.2	

Tabla 17. Estabilidad analítica de los estándares para guaifenesina, dextrometorfano HBr, metilparabeno y propilparabeno.

	HPLC			UPLC		
	Condición 1	Condición normal	Condición 2	Condición 1	Condición normal	Condición 2
k'	2.4	2.5	2.3	1.3	1.3	1.3
R	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
T	1.1	1.1	1.1	1.6	1.6	1.6
N	3928	4145	4077	4272	4193	4791
tr	4.7	5.0	4.6	0.7	0.7	0.7
% recobro y di	102.4 di = 0.3	102.1	102.3 di = 0.2	100.3 di = 0.1	100.4	101.0 di = 0.7

Tabla 18. Robustez del método para guaifenesina

	HPLC			UPLC		
	Condición 1	Condición normal	Condición 2	Condición 1	Condición normal	Condición 2
k'	5.8	6.6	5.7	3.8	3.8	3.8
R	N/A	N/A	N/A	6.6	6.2	6.6
T	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4
N	3236	4722	3285	30958	28920	29137
tr	9.6	10.7	9.3	1.4	1.4	1.4
% recobro y di	103.5 di = 0.1	103.6	103.5 di = 0.1	99.8 di = 1.5	98.3	99.2 di = 0.9

Tabla 19. Robustez del método para dextrometorfano HBr

	HPLC			UPLC		
	Condición 1	Condición normal	Condición 2	Condición 1	Condición normal	Condición 2
k'	7.8	8.1	7.6	2.8	2.8	2.8
R	20.6	21.5	20.4	8.7	8.1	8.7
T	1.1	1.1	1.1	1.4	1.4	1.4
N	12339	14554	11815	5583	4806	5620
tr	12.4	12.8	12.1	1.1	1.1	1.1
% recobro y di	97.9 di = 0.2	97.7	98.0 di = 0.3	100.6 di = 1.1	99.5	101.0 di = 1.5

Tabla 20. Robustez del método para metilparabeno

	HPLC			UPLC		
	Condición 1	Condición normal	Condición 2	Condición 1	Condición normal	Condición 2
k'	12.8	13.1	12.7	5.6	5.6	5.6
R	19.1	19.6	19.7	16.2	15.3	16.2
T	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1
N	74423	76325	76431	30703	29616	30776
tr	19.3	19.7	19.1	2.0	2.0	2.0
% recobro y di	105.1 di = 1.0	106.1	104.7 di = 1.4	100.6 di = 1.1	99.5	100.0 di = 0.5

Tabla 21. Robustez del método para propilparabeno

Prueba	No. muestras	Diluyente utilizado en HPLC (mL)	Diluyente utilizado en UPLC (mL)	Relación diluyente UPLC/HPLC %	Tiempo de corrida HPLC	Tiempo de corrida UPLC	Relación tiempo de corrida UPLC/HPLC
Adecuabilidad del sistema	2	500	400	80 %	245 min	24.5 min	10 %
Linealidad del sistema	17	1250	1525	122 %	525 min	52.5 min	10 %
Precisión del sistema	Se tomó una muestra de la linealidad del sistema al 100%						
Linealidad del método	17	1250	1525	122 %	525 min	52.5 min	10 %
Exactitud y repetibilidad	8	800	850	106 %	455 min	45.5 min	10 %
Precisión intermedia	16	1600	1700	94 %	910 min	91 min	10 %
Estabilidad analítica de las muestras	4	600	280	214 %	280 min	28 min	10 %
Total	64	6000	6280	105 %	2940 min	294 min	10 %

Tabla 22. Relación de volumen de diluyente y tiempo de corrida entre UPLCvs HPLC

Reactivo / marca	Precio en dolares por L
Metanol HPLC / JT Baker	47.70
Metanol HPLC / Sigma - Aldrich	36.80
Acetonitrilo HPLC / JT Baker	56.30
Acetonitrilo HPLC / Sigma - Aldrich	42.90

Tabla 23. Lista de precios de solventes

Prueba	No. muestras	metanol utilizado en HPLC	agua utilizada en HPLC	metanol utilizado en UPLC	agua utilizada en UPLC
Adecuabilidad del sistema	2	250	250	200	200
Linealidad del sistema	17	625	625	762.5	762.5
Precisión del sistema	NA	NA	NA	NA	NA
Linealidad del método	17	625	625	762.5	762.5
Exactitud y repetibilidad	8	400	400	425	425
Precisión intermedia	16	800	800	850	850
Estabilidad analítica de las muestras	4	300	300	140	140
Total	64	3000	3000	3140	3140

Tabla 24. Relación diluentes utilizados en la validación por UPLC y HPLC

Prueba	No. Analistas	No de días en sistema HPLC	Días / analista en HPLC	No de días en sistema UPLC	Días / analista en UPLC
Desarrollo del método	1	15	15	10	10
Adecuabilidad del sistema	1	2	2	1	1
Linealidad del sistema					
Precisión del sistema					
Linealidad del método	1	2	2	1	1
Exactitud y repetibilidad	1	2	2	1	1
Precisión intermedia	2	2	4	2	4
Estabilidad analítica de las muestras	1	2	2	1	1
Total	NA	25	27	16	18

Tabla 25. Relación de analistas por día de trabajo en desarrollo y validación entre UPLC vs HPLC

Prueba	Especificación	Resultados HPLC	Resultados UPLC	Dictamen
Adecuabilidad del sistema	$k' \geq 2.0$	G = 9.2 D = 20.9 M = 25.0 P = 38.7	G = 1.2 D = 3.7 M = 2.8 P = 5.6	Cumple especificaciones
	$R \geq 1.5$	G = N/A D = N/A M = 22.2 P = 20.0	G = N/A D = 5.5 M = 7.8 P = 12.4	Cumple especificaciones
	$T \leq 2.0$	G = 1.1 D = 1.3 M = 1.1 P = 1.1	G = 1.4 D = 1.4 M = 1.2 P = 1.1	Cumple especificaciones
Linealidad del sistema	$CV \leq 1.5\%$	G = 0.4 D = 1.3 M = 0.9 P = 1.0	G = 1.4 D = 0.8 M = 0.9 P = 1.1	Cumple especificaciones
	$r^2 \geq 0.98$	G = 0.9999 D = 0.9997 M = 0.9999 P = 0.9999	G = 0.9999 D = 0.9998 M = 0.9997 P = 0.9998	Cumple especificaciones
Precisión del sistema	$CV \leq 1.5\%$	G = 0.1 D = 0.2 M = 0.1 P = 0.1	G = 0.3 D = 0.3 M = 0.3 P = 0.3	Cumple especificaciones
Linealidad del método	Cantidad adicionada vs recuperada 98.0 - 102.0 %	Se cumple para todos los analitos en todos los niveles.		Cumple especificaciones
	$m = 1$	Se incluye en el intervalo de confianza para todos los analitos en todos los niveles.		Cumple especificaciones
	$b = 0$	Se incluye en el intervalo de confianza para todos los analitos en todos los niveles.		Cumple especificaciones
	$r^2 \geq 0.98$	G = 0.9999 D = 0.9998 M = 1.0000 P = 0.9995	G = 0.9998 D = 0.9996 M = 0.9998 P = 0.9998	Cumple especificaciones
Exactitud y repetibilidad al 100%	Cantidad adicionada vs recuperada 98.0 - 102.0 %	G = 99.1 D = 98.7 M = 101.2 P = 101.8	G = 100.9 D = 101.2 M = 101.1 P = 100.0	Cumple especificaciones
	$CV \leq 1.5\%$	G = 0.1 D = 0.2 M = 0.2 P = 0.5	G = 0.3 D = 0.2 M = 0.3 P = 0.0	Cumple especificaciones
Precisión intermedia	$CV \leq 2.0\%$	G = 0.7 D = 0.9 M = 0.9 P = 1.6	G = 1.1 D = 1.4 M = 1.2 P = 1.0	Cumple especificaciones
Estabilidad analítica de la muestra muestras	$ di $	G = 0.7 D = 1.1 M = 0.1 P = 0.5	G = 0.1 D = 0.8 M = 0.1 P = 1.7	Cumple especificaciones
Estabilidad analítica de la muestra estándares	$ di $	G = 0.2 D = 0.8 M = 0.5 P = 0.1	G = 0.1 D = 0.3 M = 0.1 P = 1.2	Cumple especificaciones

Tabla 26. Condensado de validación de método analítico, donde G = guaifenesina, D = bromhidrato de dextrometorfano, M = metilparabeno, P = propilparabeno.

Condición	Sistema UPLC		Sistema HPLC	
	Ventaja	Desventaja	Ventaja	Desventaja
Dimensión de columnas	1.0 mm x 50 mm, 1.7µm 1.0 mm x 100 mm, 1.7µm 2.1 mm x 50 mm, 1.7µm 2.1 mm x 100 mm, 1.7µm		2.1 mm x 300 mm, 3-10µm 2.1 mm x 250 mm, 3-10µm 2.1 mm x 150 mm, 3-10µm 2.1 mm x 100 mm, 3-10µm 2.1 mm x 50 mm, 3-10µm 4.1 mm x 300 mm, 3-10µm 4.1 mm x 250 mm, 3-10µm 4.1 mm x 150 mm, 3-10µm 4.1 mm x 50 mm, 3-10µm	
Fase estacionaria de columnas	El empaque de la columna es de tecnología avanzada y resiste presiones de hasta 15000 psi.	A la fecha existen solamente empaques fenilo, C8 y C18	Existen todo tipo de columnas desde fase normal hasta fase reversa tales como, alúmina, fenilo, amino C4, C8, C18, etc.	La mayoría de las columnas tarda 30 minutos o más en acondicionarse, las dimensiones son muy grandes
Fase estacionaria de columnas	El empaque de la columna es de tecnología avanzada y resiste presiones de hasta 15000 psi.	A la fecha existen solamente empaques fenilo, C8 y C18	intercambio ionico, exclusión de tamaño de partícula, etc.	No resisten presiones mayores a 6000 psi
Fase móvil	La cantidad de sales en la fase móvil es mínima	No pueden ser utilizados disolventes no polares	Pueden ser utilizados disolventes no polares	Se necesita una mayor cantidad de sales en la fase móvil
Eficiencia	El número de platos teóricos es mayor de 9000 por m ²	N/A	N/A	El número de platos teóricos por m ² es de 2000
Resolución	En algunos compuestos es mayor	En algunos compuestos es menor	En algunos compuestos es mayor	En algunos compuestos es menor
Coleo	N/A	Se obtuvieron factores de coleo mayores	El factor de coleo para todos los analitos es muy bajo	N/A
Gasto de fase móvil	102.9 mL El gasto de FM es mínimo	N/A	N/A	2940 mL El gasto de FM es muy elevado
Tiempo de análisis	4.9 hrs Es relativamente corto	N/A	N/A	49 h Los tiempos de análisis son largos
Bomba de trabajo	Resiste presiones de hasta 15 000 psi	Es binaria	Es cuaternaria	Resiste presiones hasta de 6 000 psi
Volumen de inyección	N/A	1 - 20 µL	10-500 µL	N/A

Tabla 27. Ventajas y desventajas entre sistemas HPLC y UPLC.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El desarrollo y validación de los dos métodos analíticos para la determinación de guaifenesina, bromhidrato de dextrometorfano, metilparabeno y propilparabeno por HPLC y UPLC en BRE-A-COL jarabe infantil demuestran que ambos métodos analíticos satisfacen los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Los parámetros de adecuabilidad demuestran en primer término que el factor de capacidad para guaifenesina por UPLC está por debajo del límite sugerido como criterio de aceptación, pero se debe considerar que estos fueron desarrollados para métodos realizados por HPLC, Esto se justifica plenamente debido a que la guaifenesina es un compuesto muy polar y eluye rápidamente. Respecto a los demás analitos se tienen k' mayores para dextrometorfano y metilparabeno por UPLC e inversamente se obtuvieron k' mayores para guaifenesina y propilparabeno por HPLC ver tabla 8 y figuras 13, 14, 19 y 20 en las cuales se aprecian los cromatogramas de todos los analitos en ambos sistemas en escala completa.

Se obtuvo una inversión en la secuencia de elución entre metilparabeno y bromhidrato de dextrometorfano, lo cual se debe al tipo de fase estacionaria utilizada y los disolventes de la fase móvil, ya que por HPLC se utilizó una columna C8 y fosfato de sodio monobásico : metanol en el gradiente. Por otra parte para UPLC se utilizó una columna C18 y fosfato monobásico de potasio : acetonitrilo en el gradiente ver tabla 2. Por lo que las resoluciones no pueden ser comparadas para guaifenesina y dextrometorfano. Para metilparabeno y propilparabeno se obtuvieron resoluciones mayores en el método por HPLC aunque para ambos métodos se cumplen con los criterios de aceptación ver tabla 8.

Los factores de colección son menores en todos los casos y prácticamente semejantes entre sí. El número de platos teóricos varía entre cada analito y cada método, aunque los picos se logran apreciar mejor en los cromatogramas obtenidos por UPLC comparados contra los de HPLC ver figuras 15, 16, 21 y 22, en las cuales se muestran los cromatogramas en la misma escala de absorbancia para todos los analitos por ambos métodos.

De los resultados obtenidos en la linealidad del sistema se tiene que el sistema UPLC puede detectar los analitos en concentraciones 10 veces menores y con la misma escala de absorbancia que el sistema HPLC ver tabla 9.

Los parámetros obtenidos en la linealidad del sistema satisfacen plenamente para todos los analitos en ambos sistemas tanto el coeficiente de determinación como el de variación se encuentran dentro de los criterios de aceptación ver tabla 10.

Aunque el límite para precisión del sistema es de menor o igual al 2.0 % y se obtienen resultados satisfactorios, se observan CV menores en el sistema HPLC que van desde 0.1 hasta 0.2 %, por otra parte en el sistema UPLC los CV se mantienen en 0.3 % para todos los analitos ver tabla 11.

Los resultados obtenidos en la exactitud y repetibilidad del método se encuentran dentro de especificaciones aunque los recobros de todos los analitos están por encima del 100 % por UPLC y en HPLC se tienen resultados mayores y menores del 100 % ver tabla 12.

La prueba de linealidad del método satisface plenamente en todos los niveles y para todos los analitos, asimismo se demuestra que ambos métodos son lineales para los cuatro analitos ver tablas 13 y 14.

Los resultados de precisión intermedia se encuentran dentro de especificaciones y se observa que el método no tiene variaciones entre analistas y en días diferentes ver tabla 15.

Para la prueba de estabilidad las muestras y estándares preparados fueron almacenados en frascos viales de vidrio color ámbar a temperatura ambiente durante un periodo de 24 horas, al término de las cuales se obtuvieron resultados satisfactorios que se encuentran dentro de especificaciones, ver tablas 16 y 17.

Los parámetros de robustez del método para los cuatro analitos se encuentran dentro de lo esperado encontrándose una diferencia absoluta máxima de 1.4 y una mínima de 0.1 al probar el método un pH de 2.8 y 3.2 respecto al método propuesto que se realiza con un buffer de pH 3.0.

Una parte importante del presente trabajo es la diferencia en el gasto de reactivos ya que aunque en las pruebas de validación no se observan grandes diferencias, en esta parte tienen un contraste muy marcado principalmente en los tiempos de corrida y el gasto de solventes de fase móvil utilizada. Así entonces tenemos que existe una diferencia mínima en el volumen de diluyente utilizado para la preparación de estándares y muestras en la validación ya que para la validación por HPLC se utilizaron 6000 mL de diluyente y para la validación por UPLC fueron requeridos 6280 mL de diluyente, lo cual da una diferencia de 280 mL equivalente a 4.6 %.

En el caso de los tiempos de corrida considerando únicamente cada prueba, independiente del acondicionamiento de la columna, se tiene que el tiempo que se redujo de 2940 minutos (49 horas) a 294.0 minutos (4.9 horas) lo cual equivale al 10% del requerido para realizar un análisis por HPLC, lo que representa un ahorro de 2646 minutos equivalente a 44 horas. Lo cual puede ser aprovechado en muchas otras actividades ver figuras 17, 18, 23 y 24 cromatogramas de bromhidrato de dextrometorfano, guaifenesina, metilparabeno y propilparabeno en ambos sistemas todas en escala de tiempo de 35 minutos.

En el caso de los volúmenes de la fase utilizada solamente se puede dar una aproximación debido a que no puede ser cuantificado por ser un gradiente. De esta manera tenemos que multiplicar el tiempo de análisis por el flujo de la fase móvil y para HPLC se tiene un gasto de 2940 mL y para UPLC 102.9 mL que expresado en la razón porcentual UPLC/HPLC de 3.5% lo cual quiere decir que para el presente desarrollo se requirieron solamente el 3.5 % de lo requerido para un análisis por HPLC, lo que representa un ahorro de 96.5% de fase móvil en el sistema UPLC.

El costo de los solventes utilizados varía de acuerdo a la marca utilizada ya que el precio por litro, de acuerdo a las tablas 23, 24 y 25 se tiene que al utilizar metanol de la marca JT Baker el costo es de 143 dólares para la validación por HPLC y de 150 dólares para la validación por UPLC y al utilizar metanol de la marca Sigma-Aldrich los costos son de 110 y 116 dólares respectivamente. Obteniéndose una diferencia de 6 a 7 dólares más para la validación por UPLC con cualquier marca de metanol HPLC.

Debido a que en ambos sistemas la fase móvil es un gradiente y es prácticamente imposible determinar el gasto real de los solventes, consideremos que el 50% de la fase móvil es un solvente orgánico (metanol o acetonitrilo según sea el caso) y de acuerdo con la tabla 4, 5 y 22. el gasto de metanol es de 1.47 L con un costo de 70 dólares para el sistema HPLC mientras que para el sistema UPLC el gasto de acetonitrilo es de 4.8 dólares, resultando una diferencia de 65.2 dólares menos para este último.

Respecto al sueldo de un analista y considerando 10 salarios mínimos equivalente a 540 pesos/día, se tiene un gasto de 14580 pesos para el desarrollo y validación por HPLC y de 9720 pesos para el sistema UPLC. Con una diferencia de 4860 pesos menos para el sistema UPLC.

En síntesis se tiene un gasto total de 213 dólares más 14580 pesos para el sistema HPLC y de 152.5 dólares y 9720 pesos para el sistema UPLC ver tabla 28.

Concepto	Desarrollo y validación por HPLC		Desarrollo y validación por UPLC	
	Costo en dólares	Costo en pesos	Costo en dólares	Costo en pesos
Metanol JT Baker	143+70	NA	150	NA
Acetonitrilo JT Baker	NA	NA	2.5	NA
Sueldos	NA	14580	NA	9720
Total	213	14580	152.5	9720
Diferencia	+ 60.5	+ 4860	- 60.5	- 4860

Tabla 28. Relación de costos en el desarrollo y validación entre HPLC y UPLC

El tiempo de análisis por HPLC es de 9 h desde la recepción hasta la emisión del resultado y el tiempo de análisis por UPLC es de 3.5 h, con lo cual se obtiene una diferencia de 5.5 h, tiempo que se puede ocupar para seguir la etapa de acondicionamiento en línea el mismo día y hasta en el mismo turno de trabajo de la gente de producción.

Por otra parte el costo de un análisis por HPLC es de 6.44 dólares y 540 pesos en comparación con el costo del análisis por UPLC que disminuye a 1.15 dólares y 270 pesos. Obteniéndose así una diferencia de 5.29 dólares y 270 pesos menos para la realización de este último.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y analizados previamente se concluye que:

Mediante el sistema UPLC es posible desarrollar métodos analíticos validables en un periodo de tiempo menor.

De acuerdo a los parámetros de desempeño obtenidos en la validación del método analítico se demostró experimentalmente que los dos métodos son equivalentes respecto a todos los parámetros

El uso del UPLC reduce considerablemente los tiempos de análisis hasta en un 90% comparado contra un sistema HPLC sin comprometer la calidad del análisis del medicamento, al momento de realizar la valoración de todos los analitos.

El uso del UPLC reduce considerablemente el costo en el desarrollo, validación y análisis de rutina de métodos analíticos.

La limitante principal del sistema UPLC radica en la cantidad imitada de columnas en el mercado.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Scott RPW. Liquid Chromatography for the Analyst Chromatographic Science Series. Vol. 67. New York. Sanki Laboratories Inc. 1996. p.2-3
2. Ettre LS. The Centenary of the invention of Chromatography. Mmwr [en línea] 2003[fecha de acceso 13 de diciembre de 2007]; 41 (5) URL disponible en: <http://www.j-chrom-sci.com/abstracts/2003/may-june/225-ettre.html>
3. Rubinson JF, Rubinson KA. Química Analítica Contemporánea. México: Prentice Hall Hispanoamericana; 2000. p. 405.
4. Scott RPW. Liquid Chromatography for the Analyst Chromatographic Science Series. Vol. 67. New York. Sanki Laboratories Inc. 1996. p.3-4.
5. Ettre LS. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993) Pure & Applied Chemistry. Mmwr [en línea] 1993 [fecha de acceso 14 de diciembre de 2007]; 65 (4): 823. URL disponible en: <http://goldbook.iupac.org/C01075.html>.
6. Rubinson JF, Rubinson KA. Química Analítica Contemporánea. México: Prentice Hall Hispanoamericana; 2000. p. 409.
7. Quattrocchi OA, Andrizzi SA, Laba RL. Introducción a la HPLC aplicación práctica. Argentina: Artes Gráficas Farro; 1992. p. 1-4.
8. Quattrocchi OA, Andrizzi SA, Laba RL. Introducción a la HPLC aplicación práctica. Argentina. Artes Gráficas Farro; 1992. p. 5-7.
9. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª ed. México: Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud; 2004: 367-382.
10. Douglas AS, James JL. Análisis Instrumental. 4ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill; 1994: 731-770.
11. Rubinson JF, Rubinson KA. Química Analítica Contemporánea. México: Prentice Hall Hispanoamericana; 2000: 444-457.
12. Colyer C. The van Deemter Equation: a three act play. MMWR [en línea] 2002 [fecha de ingreso 20 de diciembre de 2007]. Carolina: Wake Forest University URL disponible en: http://ublib.bufo.edu/librariees/projects/cases/vandeemter/vandeemter_notes.pdf
13. Swartz ME. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. MMWR [en línea] 2005 [fecha de acceso 21 de diciembre de 2007]; URL disponible en:

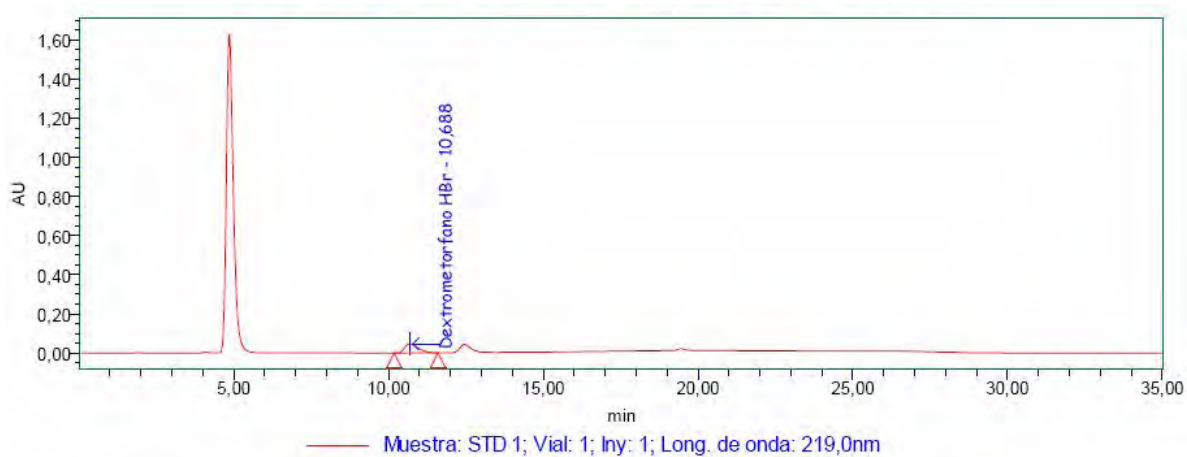
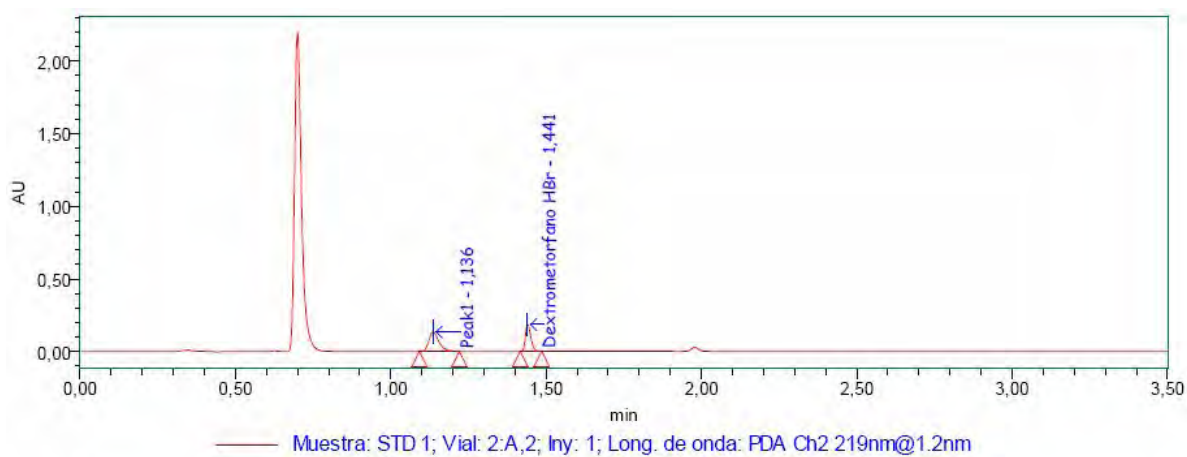
-
- <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard//lcgc/242005/164646/article.pdf>
14. Analysis of Analgesics by UFLC. MMWR [en línea] [fecha de acceso 21 de diciembre de 2007]; URL disponible en: http://www.ssi.shimadzu.com/apps/files/SSI_Analgesics_analysis_en.pdf
 15. Benzodiazepine Analysis for UFLC MWR [en línea] [fecha de acceso 21 de diciembre de 2007]; URL disponible en: http://www.ssi.shimadzu.com/apps/files/SSI_HPLC_UFLC_Benzodiazepines.pdf
 16. Fast LC Analysis of Soft Drinks. MWR [en línea] [fecha de acceso 21 de diciembre de 2007]; URL disponible en: http://www.ssi.shimadzu.com/apps/files/SSI_FastLC_beverages.pdf
 17. Analysis of barbiturates by UFLC, MWR [en línea] [fecha de acceso 21 de diciembre de 2007]; URL disponible en: http://www.ssi.shimadzu.com/apps/files/SSI_HPLC_UFLC_Barbiturates.pdf
 18. Fast Analysis of Cortisol and Cortisone in Urine, MWR [en línea] [fecha de acceso 21 de diciembre de 2007]; URL disponible en: http://www.ssi.shimadzu.com/apps/files/SSI_HPLC_UFLC_Cortisol_analysis.pdf
 19. Fast Analysis of Drugs in Urine, MWR [en línea] [fecha de acceso 21 de diciembre de 2007]; URL disponible en: http://www.ssi.shimadzu.com/apps/files/SSI_HPLC_UFLC_Drug_analysis.pdf
 20. Wren SAC, Tchelitcheff P. Use of Ultra-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical development, Journal of Chromatography A(Amsterdam) 2006; 1119 (1-2): 140-146.
 21. Wren SAC. Peak Capacity in Gradient Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis(Amsterdam) 2005; 38 (2): 337-343
 22. Apollonio LG, Pianca DJ, Whittall IR, MaherWA, Kyd JM. A Demonstration of the use of Ultra-Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry [UPLC/MS] in the Determination of Amphetamine-Type Substances and Ketamine for Forensic and Toxicological Analysis, Journal of Chromatography B (Amsterdam) 2006; 836 (1-2): 111-115.
 23. Douglas AS, James JL. Análisis Instrumental. 4ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill; 1994: 731-770.

24. Chávez Carpinteyro MJ. Propuesta de un Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la Cuantificación de Fitofarmaco β -escina en solución (tesina licenciatura). México DF: UNAM FES Zaragoza; 2003: 7-250.
25. Avila EMA. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la Cuantificación de Ácido Acetilsalicílico en Tabletas Solubles por UPLC (Ultra Performance LC) (tesis de licenciatura). México DF: UNAM FES Zaragoza; 2005:16-30.
26. Comisión de validación de métodos. Guía de Validación de Métodos Analíticos 2ª ed., Colegio Nacional de Químicos Biológicos AC. MéxicoDF. 2002.
27. USP 30 – NF 25. United States of America; The United States Pharmacopeial Convention. Vol 1; 2007: 680-683.
28. Budavari S. The Merck Index. 13a ed. Whitehouse Station NJ, Meck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. ; 2001: 812
29. Charman AO, Chase GD, Gennaro AR, Gibson HR. Granbery CB. Harvey SC. et al. editors. Remington's Pharmaceutical Sciences. 16ª ed. Easton Pennsylvania. Mack Publishing Company. 1980: 1377
30. Diccionario de especialidades farmacéuticas PLM. 51ª ed. México: Thomson; 2005: 862
31. Lane LL, Auckner RS. Pharmacology and the Nursing Process. St Louis Missouri: Mosby; 1999. p. 468.
32. Bowman WC, Rand MJ. Farmcología Bases Bioquímicas y patológicas aplicaciones clínicas. México: Interamericana; 1985: 24.10
33. American Hospital Formulary Service (AHFS). Drug Information. Ed By Mc Evoy, G.K. Wisconsin, USA: American society of Healt System Pharmacist; 2008.
34. Advice for the Patient. Drug Information in lay language (USP DI) Vol. 2. 27a ed. Massachusetts: Rand Mc Nally; 2007: 1537–1538.
35. Lacy C, Armstrong L, Goldman M, Lance L. Drug Information Handbook International. 2008-2009. 2008 15a ed. Canadá: Lexi-Comp ; 2007: 750-751.
36. Advice for Patient. Drug Information in lay language (USP DI) Vol. 2.27ª ed. Massachusetts: Rand Mc Nally; 2007: 1537-1538.
37. Budavari S. The Merck Index. 13a ed. Whitehouse Station NJ, Meck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. ; 2001: 1392

38. Reynolds JEF. Martindale The Extra Pharmacopoeia. 29^a ed. London: The Pharmaceutical Press; 1989: 1450.
39. Charman AO, Chase GD, Gennaro AR, Gibson HR. Granbery CB. Harvey SC. et al. editors. Remington's Pharmaceutical Sciences. 16^a ed. Easton Pennsylvania. Mack Publishing Company. 1980: 1376.
40. Diccionario de especialidades farmacéuticas PLM. 51^a ed. Mexico: Thomson; 2005: 482.
41. Brunton LL. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of therapeutics, 11^a ed. MC. Graw Hill; 2006. p. 578-579, 1816.
42. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica, 10a ed. El Manual Moderno; 2007. p. 520.
43. Budavari S. The Merck Index. 13a ed. Whitehouse Station NJ, Meck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. ; 2001: 1041
44. Reynolds JEF. Martindale The Extra Pharmacopoeia. 29^a ed. London: The Pharmaceutical Press; 1989: 1088.
45. Kibe AH. Hand Book of Pharmaceutical Excipients. 3a ed. Pharmaceutical Press. London 2000. 310-311
46. Budavari S. The Merck Index. 13a ed. Whitehouse Station NJ, Meck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. ; 2001: 1406
47. The Handbook Of Excipients pag 411-414
48. Requisitos de uniformidad para manuscritos presentados a revistas biomédicas Normas de Vancouver: <http://www.terra.es/personal/duenas/vanco.htm>
49. Requisitos de uniformidad para manuscritos presentados a revistas biomédicas Normas de Vancouver: <http://www.um.es/eglobal/normas/vancouver.pdf>
50. Lachman L, The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, USA, 3^a Ed Lea&Febiger, 1986.
51. Jenkins, L.G; Quantitative Pharmaceutical Chemistry, Cartensen Drug Stability, USA, 77-144.
52. Prado FM, Covarrubias Herrera MR. Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. Primera edición. México, D.F.: CBS; 1996:1-84.
53. CDER (2000). Guidance for Industry: Analytical methods validation. Food and Drug Administration, USA.

54. Grumbach Eric S., Developing Columns for UPLC: Design Considerations and Recent Developments., Separation Science Redefined, USA May 2005, 40-44.
55. King S, Stoffolano Peter J., The Evaluation and Application of UPLC for The Rapid Analisis of Doses Formulations., Separation Science Redefined, USA May 2005, 36-39.
56. Beattie I, Joncour K., Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled to Orthogonal Quadropole TOF-MS(MS) for Metabolite Identification., Separation Science Redefined, USA May 2005, 22-30.
57. Jerovich A, LoBruto R.The Use Of Acquity in Pharmaceutical development, separation science redefined, usa may 2005 15-21
58. Yang Y, Hodges C., Assay Transfer from CLAR to UPLC for Higer analisis Throughput., Separation Science Redefined, USA May 2005, 31-35
59. Castañeda Pedro, Guía CIPAM Validación de métodos analíticos. Comité de elaboración de guías oficiales de validación de la Dirección General de Control de Insumos para la salud. Secretaría de salud. 1983

XI. ANEXOS

**Figura 13** Cromatograma en HPLC de bromhidrato de dextrometorfano en escala completa**Figura 14** Cromatograma en UPLC de bromhidrato de dextrometorfano en escala completa

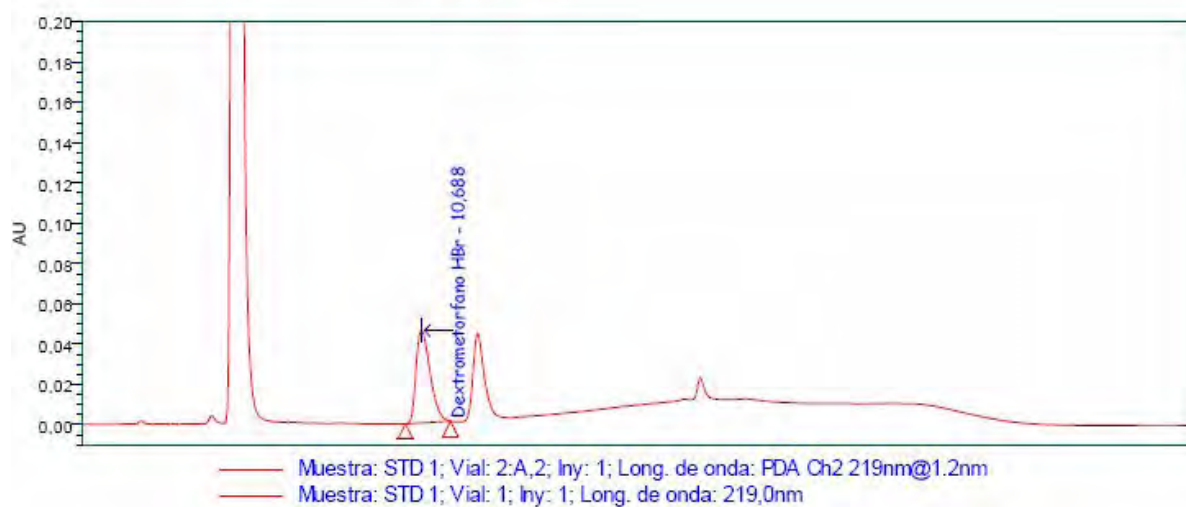


Figura 15 Cromatograma en HPLC en misma escala de absorbancia que el Cromatograma por UPLC

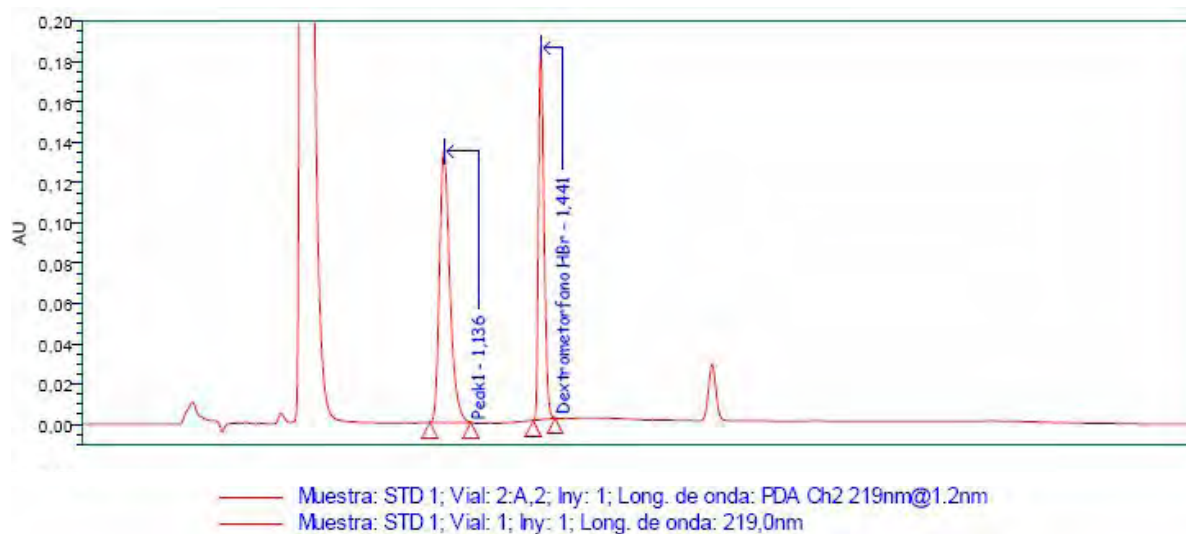


Figura 16 Cromatograma en UPLC en misma escala de absorbancia que el Cromatograma por HPLC

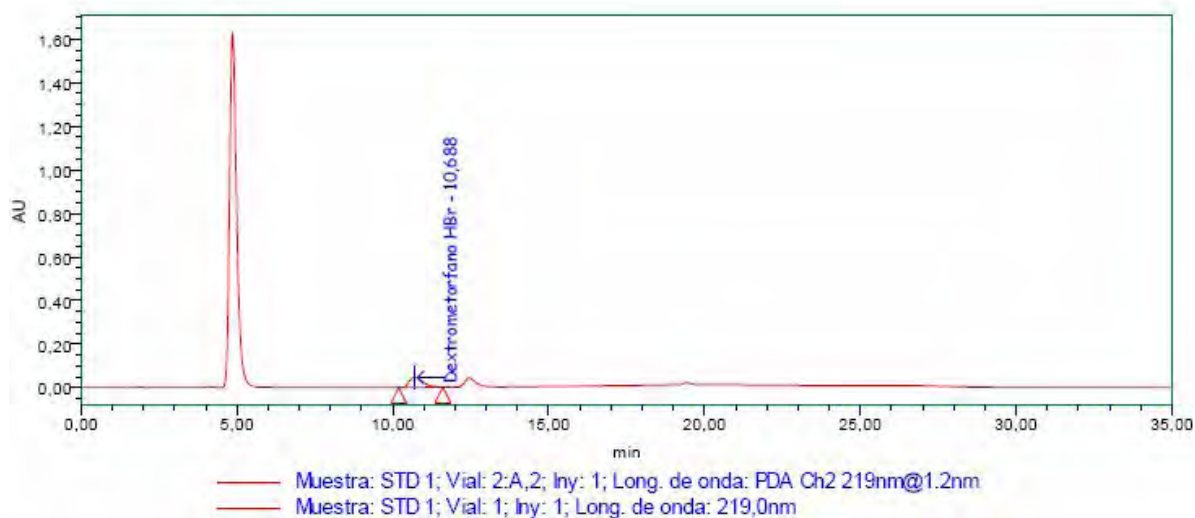


Figura 17 Cromatograma en HPLC escala de tiempo 35 minutos



Figura 18 Cromatograma en UPLC escala de tiempo 35 minutos

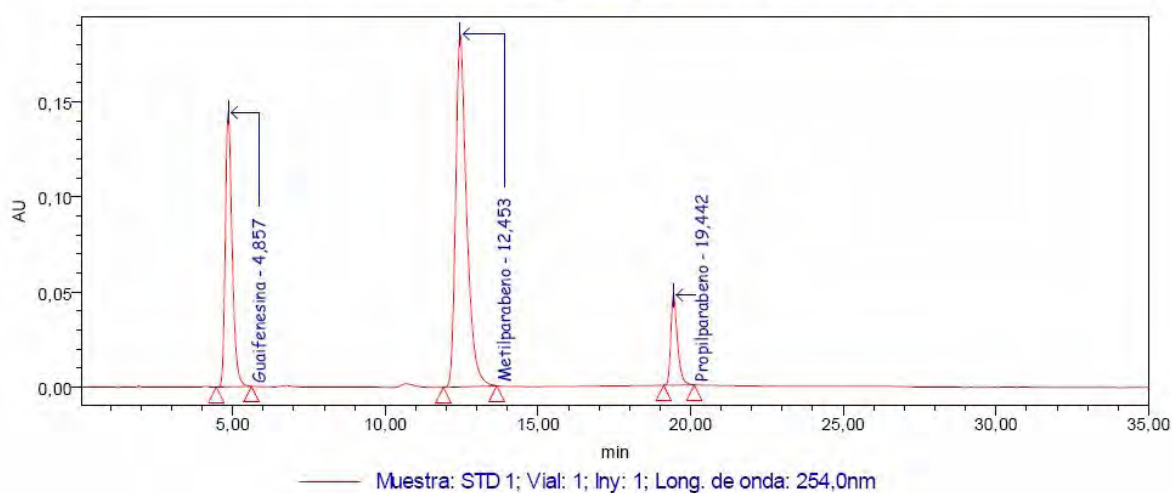


Figura 19 Cromatograma en HPLC de Guaifenesina, Metilparabeno, y Propilparabeno en escala completa

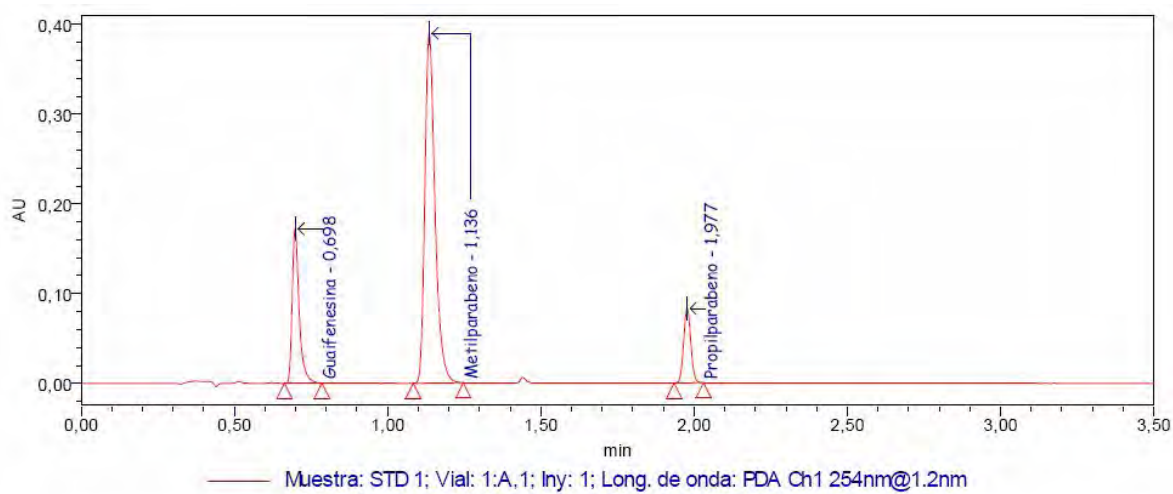


Figura 20 Cromatograma en UPLC de Guaifenesina, Metilparabeno, y Propilparabeno en escala completa

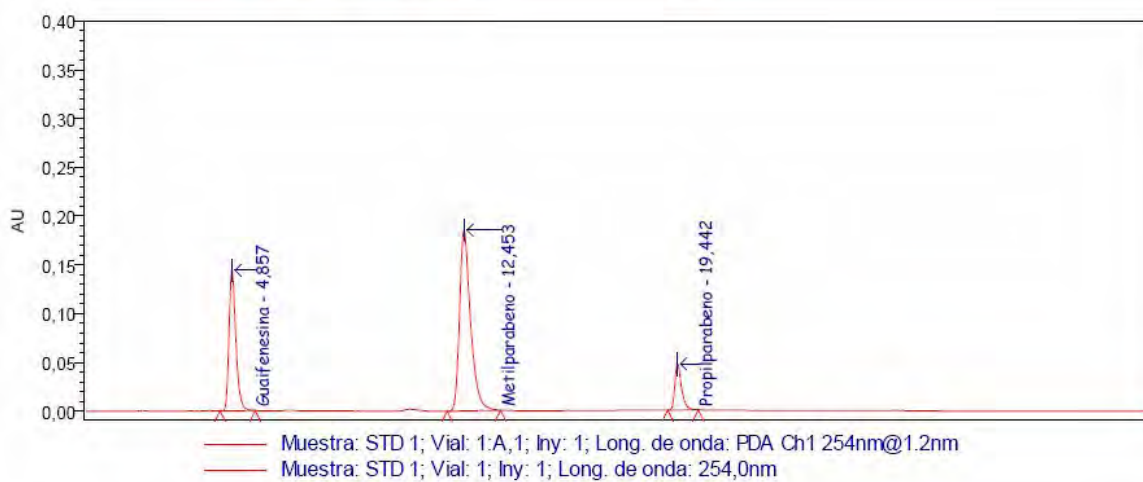


Figura 21 Cromatograma en HPLC en misma escala de absorbancia que el Cromatograma por UPLC

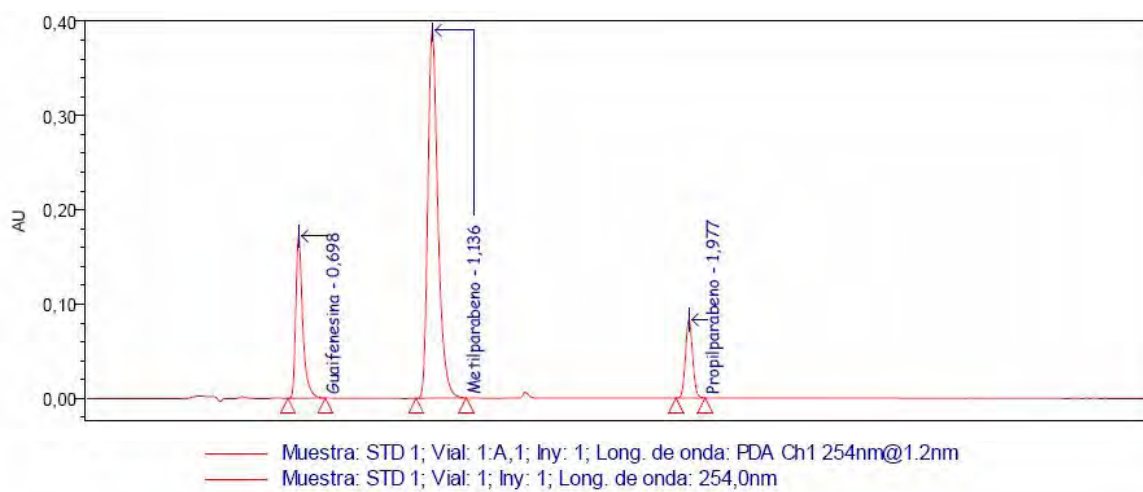


Figura 22 Cromatograma en UPLC en misma escala de absorbancia que el Cromatograma por HPLC

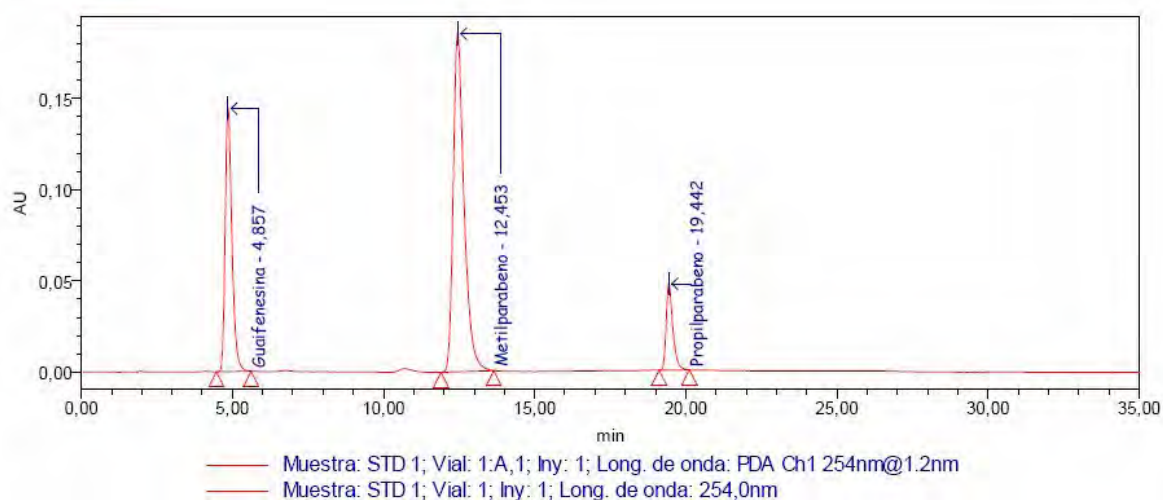


Figura 23 Cromatograma en HPLC para guaifenesina, metilparabeno y propilparabeno en escala de 35 minutos

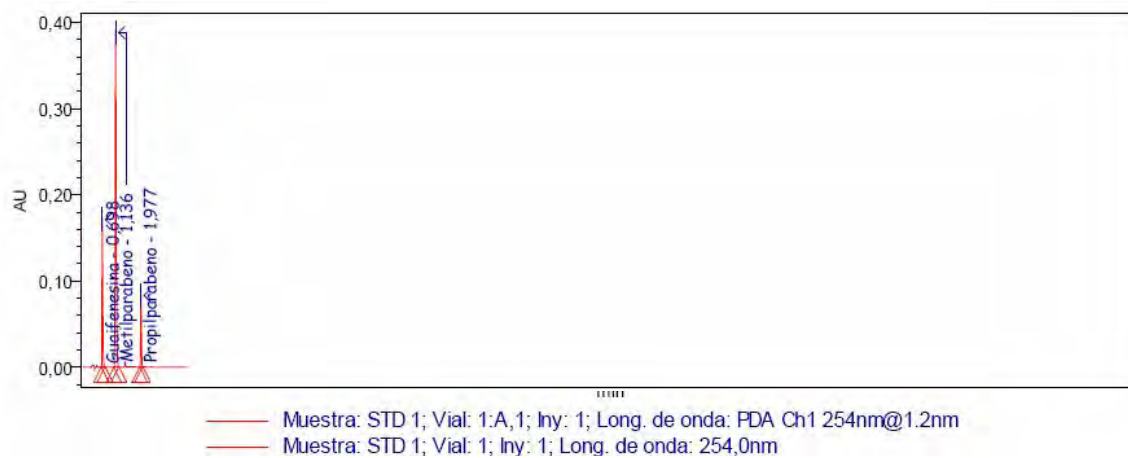


Figura 24 Cromatograma en UPLC para guaifenesina, metilparabeno y propilparabeno en escala de 35 minutos