



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICAR FENOL Y BENZOCAÍNA EN UN ENJUAGUE
BUCAL”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO
BIÓLOGO

PRESENTA: Ma. Elena Ramírez Carrillo

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. Domitila Burgos Jara

ASESOR DE TESIS: Q.F.B. Teresa Benítez Escamilla

México, D.F. Septiembre 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

1. Introducción	4
2. Marco Teórico	6
2.1 Colutorios	6
2.1.1 Definición e historia	6
2.1.2 Componentes	7
2.1.3 Ventajas y desventajas de los colutorios	10
2.1.4 Métodos de Fabricación	10
2.2 Métodos analíticos	11
2.2.1 Definición	11
2.2.2 Clasificación de métodos analíticos	13
2.2.3 Cromatografía líquida de alta resolución	14
2.2.4 Fundamentos teóricos de la cromatografía de alta resolución	17
2.2.5 Constante de distribución y separación	18
2.2.6 Retención y distribución	19
2.2.7 Resolución	21
2.2.8 Columnas cromatográficas	23
2.2.8.1 Características geométricas y químicas de una columna	23
2.2.8.2 Características químicas	24
2.3 Análisis de muestras por cromatografía de alta resolución	24
2.4 Validación de métodos analíticos	27
2.4.1 Parámetros	28
2.4.1.1 Precisión del sistema	29
2.4.1.2 Linealidad del sistema	29
2.4.1.3 Especificidad	29
2.4.1.4 Exactitud del método	30
2.4.1.5 Linealidad del método	30
2.4.1.6 Precisión del método	31
2.4.1.7 Robustez	31
2.4.1.8 Estabilidad Analítica de la muestra	31
2.5 Propiedades Fisicoquímicas de los fármacos en estudio	32
2.5.1 Benzocaína	32
2.5.2 Fenol	35
3. Planteamiento del problema	38
4. Objetivos	39
5. Hipótesis	40
6. Diagrama de flujo	41
7. Metodología	43
7.1 Desarrollo de la investigación	43
7.2 Metodología para la validación del método	47
7.2.1 Parámetros	47
7.2.2 Adecuabilidad del sistema	47
7.2.3 Precisión del sistema	47
7.2.4 Linealidad del sistema	48
7.2.5 Especificidad	49
7.2.5.1 Para método de contenido	49

7.2.5.2 Para método indicador de estabilidad	50
7.2.6 Exactitud y repetibilidad del método	51
7.2.7 Linealidad del método	52
7.2.8 Precisión del método	54
7.2.9 Estabilidad analítica de la muestra	55
8. Resultados	56
8.1 Método	56
8.1.1 Método desarrollado	63
8.2 Resultados de la validación	66
8.2.1 Adecuabilidad del sistema	66
8.2.2 Precisión del sistema	67
8.2.3 Linealidad del sistema	67
8.2.4 Especificidad	70
8.2.4.1 Para método de contenido	70
8.2.4.2 Para método indicador de estabilidad	70
8.2.5 Exactitud y repetibilidad del método	71
8.2.6 Linealidad del método	73
8.2.7 Precisión del método	77
8.2.8 Estabilidad analítica de la muestra	78
8.2.9 Tabla de resultados	79
9. Análisis de resultados	81
9.1 Desarrollo del método	81
9.2 Validación del método	82
10. Conclusión	85
11. Referencias Bibliográficas	86
12. Anexos	90
12.1 Símbolos y abreviaturas	90
12.2 Cromatogramas representativos de la Validación	91

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el mercado farmacéutico tiene alcances mundiales y los progresos en ciencia y tecnología han llevado al desarrollo de nuevos productos, como es el caso de los colutorios, soluciones acuosas con principios activos terapéuticos y determinados ingredientes que permiten conseguir una higiene completa, reducir eficazmente la placa dentobacteriana que no se elimina con facilidad.

Debido a esto crece la necesidad de disponer de métodos para la determinación de compuestos activos, a fin de poder asegurar la identidad, efectividad, potencia, inocuidad y pureza de los productos hasta el momento de su uso. Estos métodos muchas veces no se encuentran publicados en las obras oficiales que generalmente se consultan: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), Farmacopea Británica, Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), Farmacopea Europea, Farmacopea Japonesa, entre otras. Esto hace necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis en el laboratorio.

Desde el siglo pasado las separaciones analíticas se llevaban a cabo por métodos clásicos como son precipitación, destilación y extracción. Los crecientes esfuerzos por conocer más sobre la composición y función de sustancias químicas, han obligado a los científicos a buscar técnicas, cada vez más precisas.

Para elegir una técnica de separación además de tener en cuenta los criterios económicos y de accesibilidad hay que atender a dos tipos de consideraciones:

a) Una tiene que ver con las propiedades físicas estructurales de las moléculas que se pretenden separar, o de las características de la matriz en que se encuentran.

b) Otra se deriva de los objetivos del análisis (sensibilidad, resolución, tiempo de análisis, necesidades de una detección específica, entre otros).

El método de selección incluye los pasos necesarios para la obtención, preparación y posible fraccionamiento de la muestra, la aplicación de la técnica analítica adecuada y el tratamiento de los datos obtenidos. Actualmente las técnicas más empleadas, son las de cromatografía, que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchos casos resulta imposible por otros medios. Se pueden separar moléculas en función de sus cargas, tamaño y masas moleculares, también a

través de la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, etc. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación.

Las Normas Oficiales Nacionales como la NOM-059-SSA1-2006 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, PROY-NOM-164SSA1-2005 Buenas prácticas de fabricación para fármacos y la NOM-073-SSA1-2005 Estabilidad de fármacos y medicamentos, establecen que los métodos de análisis para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en la FEUM o en cualquier farmacopea internacional deberán ser validados.

Este trabajo tuvo como finalidad diseñar y desarrollar una metodología de análisis confiable e indicativa de estabilidad, por la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de Fenol y Benzocaína; dos de los principales activos de un enjuague bucal (formulación magistral), desarrollado en la planta piloto de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza campus II. Las razones de la preferencia de esta técnica se dieron debido a la alta complejidad de la fórmula del enjuague bucal, ya que la presencia de algunos componentes, generaban interferencia con los analitos de interés. Lo cual limitó la posibilidad de utilizar alguna otro tipo de técnica. Por lo anterior se decidió utilizar una metodología cuantitativa por HPLC, dada su alta capacidad de separación, su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de todo tipo de componentes, y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia.

Para el desarrollo de la técnica fue necesario conocer las propiedades de la formulación y las características fisicoquímicas de los principios activos, como estructura química, valores de pK (constante de solubilidad), y absorción ultravioleta.

Finalmente el método fue validado según lo recomendado por la Guía de validación de métodos analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, evaluando el método de acuerdo a las características de desempeño.

El desarrollo y la validación del método se realizaron en un laboratorio de control de calidad de una empresa privada demostrando que cumple con los criterios para el que fue diseñado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 COLUTORIOS ^(1, 2,41)

2.1.1 DEFINICIÓN E HISTORIA

Un colutorio es una solución acuosa con principios activos terapéuticos y determinados ingredientes que permiten conseguir una higiene completa, reducir eficazmente el biofil oral, (película bacteriana) que no se elimina con facilidad de la superficie dentaria, actúa sobre amígdalas, mucosa oral y encías.

El empleo de enjuagues de soluciones fluoradas se desarrolló como medida de salud comunitaria a partir de la década de los 60's, sobre todo en programas escolares en Estados Unidos y países escandinavos, y su uso se ha extendido considerablemente hasta nuestros días, tanto de manera colectiva, así como su uso doméstico.

La mayoría de los estudios realizados, les atribuyen una actividad anticaries de alrededor del 30%, si bien en los últimos años la efectividad de los colutorios fluorados como programa comunitario ha sido discutida. No obstante sigue considerándose una excelente medida para la población con bajos niveles de consumo de dentífricos.

La reducción de caries es similar con los enjuagues, diarios o quincenales y afecta más las superficies lisas e interproximales que las oclusales. En los adultos también se han demostrado eficaces en el control de caries coronales y radiculares.

La indicaciones de uso doméstico de los colutorios en pacientes individuales se reducen a los paciente con un riesgo de caries alto o moderado, tanto en niños como en adultos. En los niños se aconseja realizar enjuagues bucales con 5 mL de solución y no debe recomendarse a menores de 6 años. El uso comunitario actualmente se recomienda en grupos con riesgo elevado de caries o cuando no exista un consumo regular de pasta dentífrica por parte de los niños de la población.

La caries es una enfermedad muy frecuente en el hombre y se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana. Las bacterias fabrican ese ácido a partir de los restos de alimentos de la dieta que se les quedan

expuestos. La destrucción química dental se asocia a la ingesta de azúcares y ácidos contenidos en bebidas y alimentos, también se puede deber a la mala higiene bucal, a factores hereditarios, a la composición química del esmalte, la actividad muscular, el sistema inmunitario, la saliva y la edad . Tras la destrucción del esmalte le sigue la dentina y alcanza la pulpa dentaria, produciendo su inflamación y posterior necrosis.

La gingivitis es una enfermedad bucal generalmente bacteriana que provoca inflamación y sangrado de las encías, cuando pasa al estado crónico tiene consecuencias de movilidad dentaria, sangrado excesivo y perdido de hueso que sostiene los dientes. Esta enfermedad también se asocia a factores sistémicos como la pubertad, ciclo menstrual al embarazo, a la diabetes, leucemia, pero la causa principal es la acumulación de placa bacteriana. Si se deja sin tratamiento puede progresar a periodontitis, que es la principal causa de pérdida dental en adultos.

2.1.2 COMPONENTES ^(3, 4, 5)

Los componentes utilizados durante la fabricación de colutorios son básicamente los mismos que los utilizados durante la fabricación de una solución oral, en la siguiente tabla (1) se muestran algunos componentes y aditivos de una solución:

EXCIPIENTE	FUNCIÓN	EJEMPLOS
Principio activo	Define la función terapéutica del medicamento.	Triclosan, Cloruro de cetil piridinio, Gluconato de clorhexidina, Flúor, Sales metálicas, Fénoles, entre otros
Cosolvente.	Incrementan la solubilidad de las sustancias pobremente solubles en agua.	Alcohol, glicerina, sorbitol, propilenglicol.
Edulcorante.	Enmascara el amargo e inaceptable sabor de los componentes de la fórmula.	Sacarosa, sorbitol, glucosa líquida, sacarina, aspártame, fructosa, ciclamato, sucralosa, entre otros.
Conservador	Impide la proliferación microbiana por inhibición o retraso del crecimiento	Ésteres del ácido p-oxibenzoico, ácido benzoico, ácido sórbico, ésteres metílico y propílico (parabenos).
Amortiguadores de pH.	Estabiliza el pH.	Soluciones reguladoras de fosfatos, acetatos, citratos,

		entre otros.
Antioxidante.	Previene la oxidación de otras moléculas.	Sulfitos, ácido cítrico, ácido ascórbico, ac. tartárico, ac. fosfórico, ac. láctico, sorbitol, EDTA y sus sales, entre otros.
Saborizante.	Enmascara el desagradable sabor del fármaco.	Ácido cítrico, tartárico, glutamato de sodio, saborizantes como, vainilla, uva, limón, lima, naranja, cereza, frambuesa, anís, menta, entre otros
Colorante.	Confiere color para su identificación y aceptación visual.	Amarillo de quinolina, amarillo ocaso, eritrosina, tartracina.

Tabla (1). Componentes y aditivos en una solución

Es necesario mencionar que en el caso de colutorios, como suele ocurrir con otras formas farmacéuticas, este puede no contener principios activos, es decir actúa como un placebo. En aquellos casos donde el colutorio contiene principios activos, estos son muy variados, a continuación se mencionaran los utilizados con mayor frecuencia:

- Flúor: El flúor tiene acción preventiva en las caries a través del aumento de la resistencia del esmalte a la desmineralización y el incremento de la remineralización de las lesiones iniciales.
- Sales metálicas: las sales de estaño cobre y zinc han atraído el especial interés de los investigadores por su efecto sobre el control de la placa bacteriana.
- Agentes oxidantes: el interés en el uso de agentes oxidantes se deriva principalmente de su capacidad para tratar la gingivitis. Algunos de los más empleados son: peróxido de urea, de carbamida, metálicos y sales oxidantes.
- Fenoles: los fenoles se han utilizado por mucho tiempo como control de placa, En el mercado la marca más famosa que los usa es Listerine®
- Triclosan: este agente antimicrobiano podría considerarse un compuesto fenólico, por si solo tiene una acción antimicrobiana moderada sobre el control

de la placa, pero combinado con el citrato de zinc, la eficacia para combatir la placa dental y la gingivitis aumenta mucho.

- Clorhexidina: es una bisbiguanida que se ha usado extensamente como desinfectante cutáneo y cuya eficacia antiplaca fue demostrada en estudios sobre el control de la gingivitis. La eficacia de esta, en el control de la gingivitis se considera el modelo respecto al cual se mide la eficacia de todos los demás agentes antiplaca, y aún no ha sido superada por ninguno.

En la formulación del enjuague bucal en estudio, la Benzocaína y el Fenol son dos de los principios activos, que tienen como función ser anestésico y antiséptico respectivamente

Los anestésicos son sustancias que interfieren con la percepción de las sensaciones y se dividen en: anestésicos generales (que bloquean todo tipo de sensación) y anestésicos locales (que actúan solamente en el sitio de administración).

Los anestésicos locales son fármacos que aplicados en concentración suficiente en su lugar de acción, impiden la conducción de impulsos eléctricos por las membranas del nervio y el músculo de forma transitoria y predecible, originando la pérdida de sensibilidad en una zona del cuerpo. Ejemplos de anestésicos locales son los siguientes: cocaína, benzocaína, procaína, tetracaína, 2-cloroprocaína, lidocaína, mepivacaína, prilocaína, bupivacaína, etidocaína y ropivacaína.

Los antisépticos son sustancias empleadas en tejidos vivos, que previene o impiden el crecimiento o la acción de los microorganismos por inhibición de su actividad. Estas sustancias pueden ser de acción bacteriostática y acción bactericida.

Bacteriostáticos: son antisépticos que consiguen frenar el crecimiento de los microorganismos. Este procedimiento es reversible por lo que cuando deja de estar presente la sustancia bacteriostática, los microorganismos pueden volver a reproducirse.

Bactericidas: son sustancias que provocan la destrucción del microorganismo pero la acción sobre el mismo es irreversible.

2.1.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS COLUTORIOS ^(1,5)

En la siguiente tabla (2) se muestran las ventajas y desventajas de un colutorio

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none">-Tiene una eficacia alta en la reducción de incidencia de caries.-Indicada para combatir y prevenir trastornos bucales, tales como caries o gingivitis, así como halitosis.-Debido a que las soluciones son mezclas homogéneas, el fármaco es distribuido uniformemente en la formulación.-Es una vía de administración sencilla.-Se puede indicar en personas con reducido flujo salival.-Se indica en personas con tratamiento de cáncer, irradiadas, y que tiene afectaciones en el sistema inmune, en diabéticos, en pacientes portadores de aparatos ortodóncicos, prótesis, etc.-Es de bajo costo.	<ul style="list-style-type: none">-Los fármacos en general son menos estables en medio líquido que en formas de dosificación sólidas.-Algunas veces resulta difícil enmascarar el inherente sabor amargo de algunos fármacos.-Los fármacos extremadamente potentes, con un índice terapéutico muy bajo no pueden formularse en soluciones orales, puesto que los pacientes pueden tener errores en la medición de la dosis.-No se puede administrar en pacientes inconscientes.-No se recomienda en niños menores de 6 años.

Tabla (2) Ventajas y desventajas en un colutorio

2.1.4 MÉTODOS DE FABRICACIÓN. ^(4, 5, 6)

La mayoría del equipo debe tener la capacidad de calentar y enfriar rápidamente para lograr la disolución de los componentes de la formulación, requieren tener adecuados los sistemas de transferencia y filtración. Los equipos son hechos con material compatible y no reactivo, tal como el acero inoxidable. El diseño y construcción de los tanques facilita la limpieza del mismo.

El método más común para fabricar es hacer una solución simple por la adición del soluto al solvente y agitar hasta formar una solución homogénea. La mayoría de los materiales utilizados pueden disolverse simplemente por agitación, pero puede emplearse calor y un alto grado de agitación, cuando se requieren soluciones más concentradas o cuando el soluto se disuelve lentamente. Los excipientes son adicionados en un orden específico, para incrementar la velocidad de disolución, los solutos presentes en cantidades pequeñas particularmente tinturas y otros intensificadores del color, deben ser disueltos antes de ser mezclados con la porción principal del lote, para asegurar su completa disolución, debido a que si son adicionados directamente al volumen de disolvente presente en el tanque, pequeñas cantidades emigran al fondo de este dificultando la disolución completa.

La mayoría de las soluciones son filtradas y clarificadas, esta etapa es llamada limpieza, una alta limpieza requiere la remoción de partículas mayores o iguales a 3 nm., para ello los filtros utilizados en la manufactura, proceso o acondicionamiento de soluciones destinadas al consumo humano no deben liberar fibras.

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS (7, 8, 9, 10, 11)

2.2.1 DEFINICIÓN

El método analítico es aquel método de investigación que consiste en la desmembración de un todo descomponiéndolo en sus partes o elementos para observar las causas, la naturaleza y los efectos. El análisis es la observación y examen de un hecho en particular. Es necesario conocer la naturaleza del fenómeno y objeto que se estudia para comprender su esencia. Este método nos permite conocer más del objeto de estudio, con lo cual se puede: explicar, hacer analogías, comprender mejor su comportamiento y establecer nuevas teorías.

El análisis químico es la parte práctica que aplica los métodos de analíticos para resolver problemas relativos a la composición y naturaleza química de la materia. Los ámbitos de aplicación del análisis químico son muy variados, en la industria destaca el control de calidad de materias primas, productos acabados y estudios de estabilidad; en el comercio los laboratorios certificados de análisis aseguran las especificaciones de calidad de las mercancías.

Es importante mencionar algunos conceptos que están ligados al análisis químico:

- Muestra: Parte representativa de la materia objeto del análisis.

- Analito: Especie química que se analiza.
- Técnica: Medio de obtener información sobre el analito.
- Método: Conjunto de operaciones y técnicas aplicadas al análisis de una muestra.
- Análisis: Estudio de una muestra para determinar sus composición o naturaleza química.
- Estándar: Es una preparación que contiene una concentración conocida de un elemento o sustancia específica.
- Estándar Primario: Es un sustancia utilizada en química como referencia al momento de hacer una valoración o estandarización. Cumple con las siguientes características: Tiene composición conocida, elevada pureza, es estable a temperatura ambiente y temperaturas mayores, para que pueda ser secado en estufa y no debe absorber gases. Tienen el aval y la certificación sobre su calidad y pureza de las diferentes farmacopeas oficiales.
- Estándar Secundario. Su nombre se debe a que en la mayoría de los casos se necesita del patrón primario para conocer su concentración exacta. Son trazables con patrones de referencia oficiales y dicha trazabilidad es demostrada

Los análisis químicos alcanzan sus objetivos mediante una metodología que se fundamenta en la aplicación del método científico. Desde un punto de vista formal, esta metodología es común a todas las ciencias experimentales y sigue un mecanismo que puede resumirse en un proceso analítico general consistente en un conjunto de procedimientos realizados para solucionar un determinado problema analítico. En la figura (1) se esquematiza este proceso:

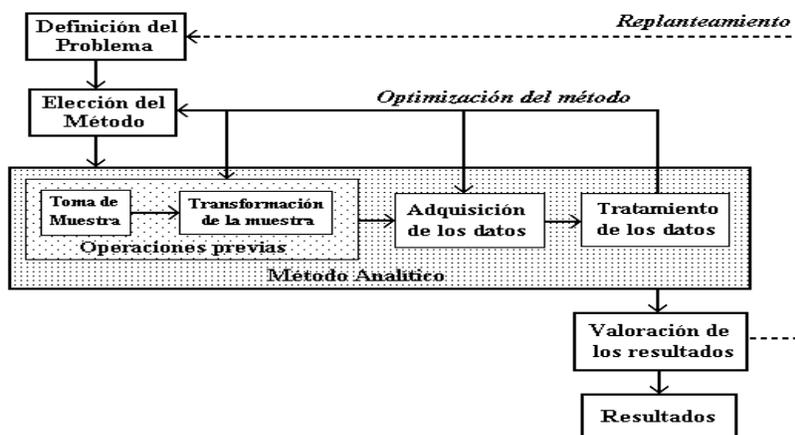


FIGURA (1) Pasos en el diseño de un método analítico

La definición del problema es la primera etapa, en ella se plantea el tipo de análisis que se necesita y la escala de trabajo. Tras ello, debe realizarse la elección del método analítico, aspecto clave para una resolución adecuada del problema. Una vez elegido el método, se procede a su ejecución.

Posteriormente, se pasa a valorar los resultados obtenidos para establecer si el problema ha sido resuelto de forma satisfactoria. Si no es así, se debería reiniciar el proceso analítico y replantear el problema. El desarrollo práctico del método analítico consta de tres etapas:

- Las operaciones previas o preliminares, pueden descomponerse en dos subetapas. En la primera, se realiza una toma de muestra representativa del material a analizar. En la segunda, se lleva a cabo una transformación de la muestra o parte de la misma, de forma que la especie o especies químicas de interés pasen a una forma medible inequívocamente. Esta transformación, de ser necesaria, podría requerir etapas de separación de sustancias interferentes y etapas de reacción química que hagan más sensible y específica la medición de la señal debida al analito.
- En la etapa de adquisición de datos tiene cada vez más importancia la instrumentación analítica. El proceso de medida instrumental básico puede separarse en tres etapas: la generación de un flujo de energía, la interacción de este flujo con la muestra, la medición y procesado de la señal procedente de la muestra.
- Por último, la etapa de tratamiento de datos consiste en el procesado matemático de los datos para obtener unos resultados que den el valor más probable de la información buscada.

2.2.2 CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ^(9, 10)

Para la aplicación de análisis químicos en la industria es necesario el desarrollo de métodos analíticos confiables, actualmente se agrupan de la siguiente manera:

- Métodos clásicos, que se basaban en propiedades químicas del analito. Se incluyen las gravimetrías, las volumetrías y los métodos de análisis cualitativo clásico.
- Métodos instrumentales, basados en propiedades químico-físicas. La clasificación de los métodos instrumentales se realiza en base a la

propiedad que se mide (espectroscópicos, electroanalíticos, térmicos, etc.).

- Métodos de separación. Se incluyen en este grupo los métodos cuya finalidad es la separación de compuestos para eliminar las interferencias y facilitar las medidas, entre ellos se encuentran la cromatografía de gases y de líquidos.

Es incuestionable que la cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada en la actualidad, las razones de la popularidad de esta técnica son: su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias.

Cuando utilizamos un método cromatográfico de alta resolución, para llevar a cabo un análisis, seguimos generalmente una receta que hemos encontrado en la bibliografía, allí se nos dice que debemos llevar a cabo una serie de operaciones para conseguir nuestro objetivo, como el tipo de columna, la fase móvil, si la elución con lleva un gradiente, longitud de onda de la detección, como debemos preparar y conservar los estándares, que flujo debemos emplear, etc. De ahí que es importante conocer un poco de los fundamentos, para poder desarrollar un método por HPLC.

2.2.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (13, 14, 15, 18, 19, 36, 37, 38, 40)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica de separación física basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil que en este caso es un líquido. En esta técnica los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases de diferente naturaleza, como consecuencia de la variación de velocidad que se establece al ser arrastrados por una fase móvil, líquida o gaseosa a través de una fase estacionaria, sólida o líquida.

La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual esta rellena con la fase estacionaria. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por

efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones lo cual genero la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que la fase móvil fluyera a velocidades razonables. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones.

Un equipo para cromatografía líquida de alta resolución puede representarse por la figura (2):

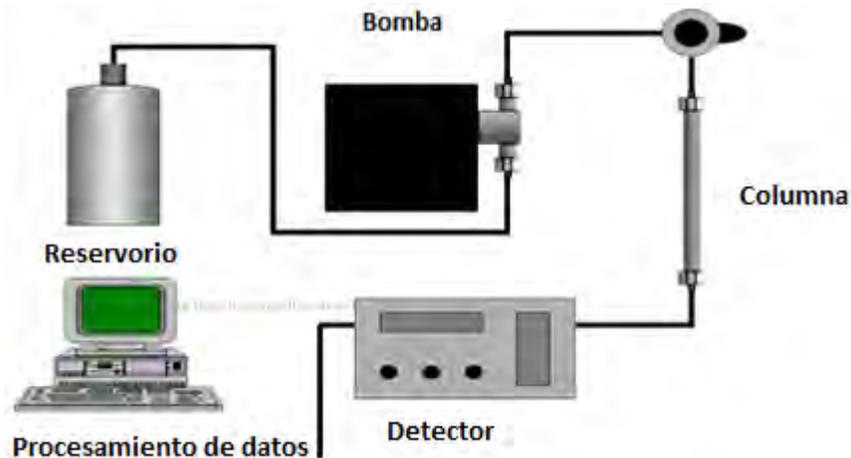


Figura (2) Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede clasificarse en:

- **Cromatografía de adsorción:** se tiene cuando la fase estacionaria es un sólido adsorbente de gran área superficial (gel de sílice, alúmina, etc.). Los centros activos situados sobre la superficie del sólido (por ejemplo, los grupos silanol del gel de sílice) interaccionan con los grupos funcionales polares de los compuestos a separar. La separación se produce como consecuencia de la distinta intensidad de las mencionadas interacciones para unos y otros compuestos. Una característica importante del adsorbente es el tamaño de partícula. En principio, la retención es proporcional al área superficial, la cual, a su vez, depende del tamaño de partícula y de la estructura interna de las partículas de adsorbente. Cuanto menor sea el tamaño de partícula, mayor será el área superficial del adsorbente y, en consecuencia, mayor el número de centros activos disponibles para la adsorción.

- **Cromatografía de reparto:** tiene lugar cuando se utiliza un líquido como fase estacionaria. Para inmovilizar este líquido se utiliza un soporte sólido (gel de sílice, celulosa, tierra de diatomeas, poli-estireno, etc.) de gran área superficial. En cromatografía líquido-líquido, para evitar que se mezclen las fases se utiliza como fases móvil y estacionaria dos líquidos de polaridades muy diferentes. Si el líquido estacionario es polar (por ejemplo, etilen-glicol), la fase móvil será no polar (por ejemplo, hexano). En este caso, los solutos polares son retenidos más fuertemente que los no polares. La forma citada es la de operación normal, si bien también puede operarse con una fase estacionaria no polar (por ejemplo, decano) y con una fase móvil polar (por ejemplo, agua). Esta forma de proceder se denomina de fase reversa. En cualquier caso, la separación se produce porque las moléculas de soluto se distribuyen entre las dos fases según su solubilidad relativa en cada una de ellas.

Existen sustancias que se comportan como ácido débil y base débil, y esto las hace ser sustancias parcialmente ionizadas a los valores neutros de pH característico de las fases móviles usuales, la **supresión iónica** se utiliza para este tipo de sustancias. Con el fin de aumentar la ionización y por ende la retención de las sustancias en el sistema de fase reversa, se utilizan ácidos en la fase móvil.

Para ácidos o bases más fuertes más fuertes que permanecen ionizados en el intervalo de pH (2 a 7) en el cual la sílice es estable la cromatografía de **apareamiento iónico** es la técnica de elección. En este método se agrega a la fase móvil un reactivo que se disocia para dar iones de carga opuesta respecto de los solutos. Los ejemplos de reactivos de apareamiento iónico son el ácido heptanosulfónico, utilizado para especies catiónicas, como las aminas protonadas y el hidróxido de tetra-n-butilamonio, que se aparea con sustancias aniónicas.

El tercer método, la cromatografía de jabón, es una forma de apareamiento iónico en el cual el reactivo agregado es un detergente o un jabón. Los ejemplos son el laurilsulfato de sodio para los catiónicos y el cloruro de cetiltrimetilamonio para los aniónicos. Esta técnica es especialmente útil para separar proteínas, dado que el jabón no solo neutraliza la carga en la molécula sino que además afecta la conformación de la proteína de una forma que le permite interactuar de manera más favorable con la fase estacionaria.

- **Cromatografía de intercambio iónico:** la fase estacionaria es una matriz rígida, en cuya superficie existen grupos funcionales cargados positiva o negativamente y contra-iones de carga opuesta, susceptibles de intercambiarse con iones de la misma carga contenidos en la columna. Frecuentemente, en cromatografía líquido-líquido, la fase estacionaria está unida químicamente al soporte sólido, en lugar de estar simplemente depositado sobre él. En este caso, se tiene la denominada cromatografía de fase enlazada (bonded-phase chromatography, BPC). El mecanismo de las separaciones por esta técnica es complejo, si bien, parece que implica una combinación de adsorción y reparto, dependiendo de las condiciones experimentales. En HPLC, la utilización de la BPC está muy generalizada. La fase móvil suele ser una solución acuosa tamponada y la separación se produce por la competencia que se establece entre los iones de la fase móvil y los iones del analito por los centros activos de la resina. Este tipo de cromatografía se utiliza ampliamente en química inorgánica para la separación de iones metálicos, así como en sistemas biológicos para la separación de compuestos iónicos solubles en agua.
- **Cromatografía de exclusión:** también se denomina cromatografía de filtración en gel o cromatografía de permeación en gel. En ella, la fase estacionaria consiste en un sólido inerte que contiene pequeños poros en los que pueden penetrar las moléculas de tamaño reducido, pero no las grandes. El grado de retención depende del tamaño de las moléculas y del tamaño de los poros. Las moléculas pequeñas pueden penetrar en los poros pequeños, mientras que las de tamaño intermedio pueden penetrar solo en algunos poros, siendo excluidas de los otros, y las moléculas grandes son excluidas completamente. Estas últimas se desplazan con la fase estacionaria y son eluidas en primer lugar. Este tipo de cromatografía resulta especialmente adecuada para la separación de especies orgánicas de peso molecular elevado de otras moléculas pequeñas.

2.2.4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ALTA RESOLUCIÓN ^(15, 16, 17, 18, 19)

Se presentan los conceptos en los que se basan las separaciones cromatográficas y aquellos parámetros que son de utilidad para comprender y mejorar la calidad de los cromatogramas.

2.2.5 CONSTANTE DE DISTRIBUCIÓN Y SEPARACIONES

Los componentes a separar, en su desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico se mueven a diferentes velocidades, dependiendo de la afinidad de cada uno por la fase estacionaria, respecto a la fase móvil. Cada uno de ellos se distribuye entre las dos fases según un equilibrio caracterizado por una constante denominada constante de distribución o coeficiente de distribución (K). Para el componente A, donde $[AS]$ es la concentración de A en la fase estacionaria, y $[AM]$ la concentración de A en la fase móvil.

A móvil \longleftrightarrow A estacionaria

$$K_A = \frac{AS}{AM}$$

Este modelo es análogo al utilizado en sistemas de extracción simple, si bien, la cromatografía es un sistema dinámico en el que los procesos de separación tienen lugar continuamente, con solutos moviéndose sobre la fase estacionaria y tratando de alcanzar el equilibrio definido por K . En cualquier caso, cuanto mayor sea el valor de K , mayor será la afinidad del componente en cuestión para la fase estacionaria y menor será la velocidad a la que se mueve a través del sistema. Para una muestra que contenga los componentes A, B y C, y que se introduzca como una banda estrecha sobre una fase estacionaria, si el componente A se desplazará a lo largo del sistema más lentamente que el B, y éste más despacio que el C.

$K_A > K_B > K_C$

En cromatografía plana, los componentes A, B y C se ponen de manifiesto por la presencia de manchas, mientras que en cromatografía de gases o en cromatografía de líquidos de alta resolución, donde normalmente se utilizan métodos instrumentales como detectores a la salida de la columna en los que se monitoriza continuamente la composición de la fase móvil, la señal obtenida es proporcional a la cantidad de soluto presente en el eluyente, con lo que se obtienen picos más o menos Gaussianos, como los representados en la figura (3).

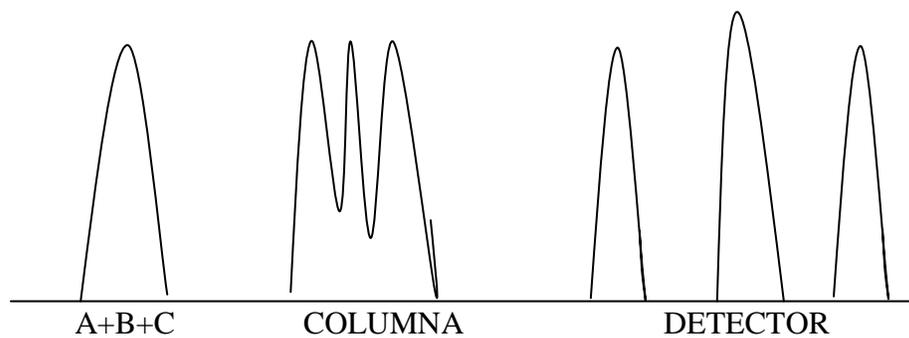
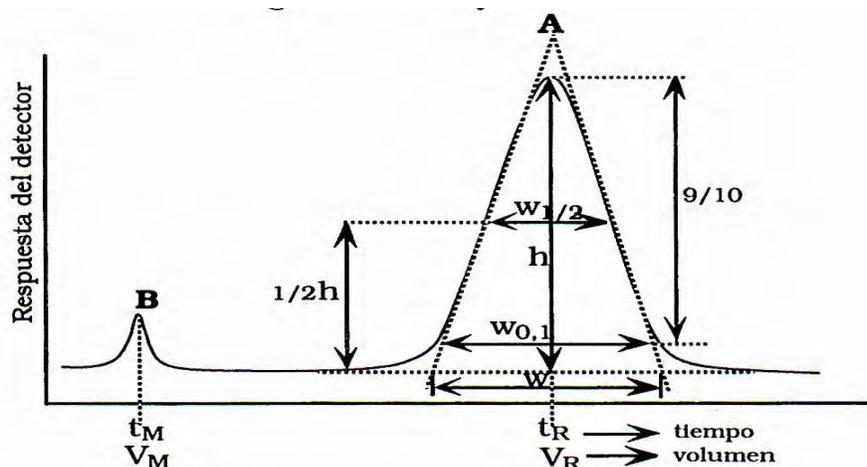


FIGURA (3) Picos Gaussianos

2.2.6 RETENCIÓN Y DISTRIBUCIÓN

El cromatograma simplificado representado en la figura (4) corresponde a una muestra que contiene un solo analito (**A**). El pico pequeño (**B**), corresponde a una especie no retenida por la columna y que a menudo está contenida en la muestra, pero que puede añadirse para facilitar la identificación de los picos. En la misma figura se muestran algunos datos y símbolos característicos.



t_M: tiempo muerto (tiempo requerido para que una especie no retenida alcance el detector)

V_M: volumen muerto (volumen de fase móvil que se requiere para eluir una especie no retenida)

t_R: tiempo de retención (tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el componente alcanza el detector)

V_R: volumen de retención (volumen de fase móvil que se requiere para eluir un soluto de la columna cromatográfica)

h: altura de pico; **w**: anchura de pico; **w_{1/2}**: anchura de pico a la semialtura

w_{0,1}: anchura de pico a un décimo de la altura

FIGURA (4) Cromatograma simplificado

La mayor o menor retención de los componentes de una muestra por la fase estacionaria depende de las correspondientes afinidades. Estas, a su vez, dependen de diversos factores, entre los que cabe mencionar:

- Interacciones electrostáticas entre especies de carga opuesta, como las que tienen lugar en separaciones por cromatografía iónica.
- Interacciones por fuerzas de Van Der Waals del tipo dipolo-dipolo (orientación) o del tipo dipolo-dipolo inducido (inducción).
- Interacciones por fuerzas de dispersión entre moléculas neutras o grupos funcionales.
- Formación de enlaces de hidrógeno.

El **tiempo de retención** puede considerarse que está constituido por dos componentes. Uno de ellos es el tiempo muerto (t_M), que es el mismo para todos los analitos en un sistema cromatográfico determinado, y el otro es el denominado **tiempo de retención ajustado**, t'_R , que es el tiempo que realmente se invierte en la retención de un soluto por la fase estacionaria, y que se define como:

$$t'_R = t_R - t_M$$

Las características de retención de los componentes suelen describirse en la práctica por el **factor de retención** o **factor de capacidad**, k' , definido como:

$$k' = \frac{\text{masa de soluto } S}{\text{masa de soluto } M} = \frac{M_s}{M_m}$$

El **factor de capacidad** es un parámetro importante porque es independiente de la velocidad de flujo de la fase móvil y de las dimensiones de la columna, y puede usarse para comparar retenciones en instrumentos diferentes. Los factores de retención grandes favorecen una buena separación, pero también incrementan el tiempo de elución y el ancho de banda. Idealmente, las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de capacidad para las especies de una mezcla oscilan entre 1 y 5.

El **volumen de retención** es un parámetro de utilidad en muchas ocasiones. De la expresión anterior se deduce que

$$V_R = V_M (1 + k')$$

y sustituyendo k' por $K V_S/V_M$, se tiene:

$$V_R = V_M (1 + K V_S/V_M)$$

ó

$$V_R = V_M + K V_S$$

que es una ecuación importante en cromatografía, si bien, en cromatografía de adsorción debe modificarse de la forma siguiente:

$$V_R = V_M + k_A A_S$$

donde k_A es el coeficiente de adsorción y A_S el área superficial del adsorbente. La capacidad de una determinada fase estacionaria para separar dos componentes **A** y **B** se expresa mediante el **factor de separación** o **factor de selectividad**, α , definido por:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

y, por otra parte, puede determinarse fácilmente de forma directa midiendo los tiempos de retención de las especies **A** y **B** sobre un cromatograma experimental, ya que,

$$\alpha = \frac{t_{RB} - t_M}{t_{RA} - t_M}$$

2.2.7 RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución es fundamentalmente una técnica separativa, es decir, su gran potencial se basa en su capacidad para separar los componentes de la muestra analizada. Cuanto mayor sea su poder de separación (su poder de **resolución** en lenguaje cromatográfico) tanto mejor habrá conseguido su objetivo.

La Resolución se cuantifica mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2(w_1 + w_2)}$$

donde w_1 y w_2 son las anchuras de las bandas sobre la línea base, t_1 y t_2 son tiempo de retención 1 y tiempo de retención 2.

El objetivo de un manejo adecuado de la Resolución es conseguir que las sustancias que componen la muestra den lugar a picos bien separados en el cromatograma. Para análisis cuantitativo es conveniente que la R_s sea superior a 1.5 e incluso mayor, ya que con el uso la columna se va degradando y perdiendo eficacia. Lo que dará lugar al ensanchamiento gradual de las bandas y a una disminución en la resolución.

Para saber cómo controlar la resolución es preciso conocer la ecuación básica de la misma.

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\sqrt{N}\right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k'}{1 + k'}\right)$$

donde,

α = Es el factor de separación entre las dos bandas, $\alpha = k'_2 / k'_1$, siendo los k' los factores de retención de las bandas.

N= Número de platos teóricos promedios de las dos bandas.

k' = El factor de retención medido de las dos bandas. Se puede determinar a partir de la fórmula $t_R = t_0(1 + k')$.

N puede medirse a partir de t_R y la $w_{1/2}$ de cualquiera de las dos bandas mediante la fórmula:

$$N = 5.54 \left[\frac{t_R}{w_{\frac{1}{2}}} \right]^2$$

Por tanto la resolución depende de tres factores **α** , **N** y **k'** que aunque están interrelacionados, pueden optimizarse independientemente. Lo más aconsejable es optimizar primero k' y después centrarse en las condiciones que afectan a α y N.

Cómo la resolución aumenta con el cociente $k'/(1+k')$, cuanto mayor sea k' mayor será la resolución pero, k' elevados implican tiempos de análisis grandes y bandas anchas que son difíciles de cuantificar. Por tanto, son preferibles valores de k' intermedios, en el rango $1 < k' < 20$, para todas las bandas del cromatograma. Los k' de las bandas aumentan o disminuyen con el aumento de la fuerza de la fase móvil.

Se puede modificar α , actuando sobre los siguientes factores:

- Tipo de solvente de la fase móvil
- pH de la fase móvil
- Fuerza de la fase móvil
- Aditivos de la fase móvil (formadores de pares iónicos, tampones, modificadores y sales)
- Tipo de columna

La temperatura se puede utilizar de forma ocasional para mejorar la selectividad de la separación, fundamentalmente con compuestos que tengan diferente tamaño y forma, o que estén parcialmente ionizados, ya que el grado de ionización depende de la temperatura.

Una vez optimizado k' y α se procede a ajustar N , seleccionando los siguientes parámetros:

- L (longitud de la columna)
- Tamaño de partículas de fase estacionaria y flujo

Hay que tener en cuenta que cuanto mayor es el valor de la longitud de la columna, mejor será la resolución, pero también será más grande el tiempo de análisis, por lo que si α tiene un valor apropiado, una columna de 8 a 10 cm puede ser suficiente. También, cuanto menor es el tamaño de partículas de la fase estacionaria, mejor resolución, pero más posibilidades de que se obstruya la columna, es aconsejable que la presión no sobrepase los 150-200 bares, debemos seleccionar aquel flujo que nos proporcione las mejores condiciones de trabajo, en cuanto a N , tiempo de análisis y sensibilidad.

2.2.8 COLUMNAS CROMATROGRÁFICAS ^(16,17, 18)

2.2.8.1 CARACTERÍSTICAS GEOMÉTRICAS Y QUÍMICAS DE UNA COLUMNA

Las características geométricas más importantes de una columna son:

- Longitud: Suele estar entre 5 y 25 cm. A mayor longitud mayor N , aunque también mayor gasto de disolventes y mayor tiempo de análisis.
- Tamaño de partícula: Oscila entre 3 y 10 μm . Cuanto menor es el tamaño, mayor N , aunque más resistente al flujo y más posibilidad de que se obture.
- Tamaño de los poros de las partículas: En general el tamaño de los poros debe ser superior a tres veces el diámetro de las moléculas a separar.
- Geometría de las partículas: Éstas pueden ser irregulares o esféricas. Cuanto más uniformes sean las partículas mayor eficacia.

2.2.8.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

La naturaleza química de la fase estacionaria puede ser muy diversa. Se trata de un adsorbente como la sílice o de una sustancia más o menos polar unida por enlace covalente a un soporte sólido. El soporte puede ser:

- Sílice (generalmente)
- Un polímero orgánico

Las fases estacionarias más utilizadas llevan la denominación: C18, C8, Diol, Ciano, Fenil, etc.

Desde el punto de vista cromatográfico las características más interesantes de una columna son N (No. De Platos Teóricos) ya que de ella depende la eficacia de la columna, que en parte puede estar demostrada por la simetría de los picos.

Son preferibles picos simétricos, ya que los picos asimétricos conducen a cuantificaciones imprecisas, pobre resolución, y falta de reproducibilidad en la retención.

2.3 ANALISIS DE MUESTRAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (17, 18, 19, 36, 37)

Las muestras que se requieran analizar mediante cromatografía líquida de alta resolución deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Soluble en la fase móvil
- La muestra debe estar limpia
- No debe reaccionar con ningún componente del sistema cromatográfico
- La cromatografía de alta resolución es ideal para muestras con:
 - Presión de vapor baja
 - Compuestos iónicos
 - Compuestos de peso molecular elevado
 - Compuestos termolábiles

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un

sólido. En cromatografía líquida de alta resolución la fase móvil puede ser un solvente puro o mezcla de solventes, además pueden contener sustancias que favorecen las separaciones.

La fase móvil debe cumplir con lo siguiente:

- Disolventes de grado cromatográfico
- Baja viscosidad
- No volátil
- Miscibilidad
- Filtrada
- Sin oxígeno disuelto (desgasificada)

Los solventes utilizados en la preparación de la fase móvil, de origen pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudiciales para los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasvasado del solvente al depósito, la degradación lenta del recipiente del solvente, o de condensación y polimerización del solvente. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba, al guarda columna, y en general causar desgaste del sistema de HPLC, por lo anterior es recomendable filtrar y desgasificar los solventes antes de usarlos.

En el instante en que se abre una nueva botella de solvente, se expone el interior del solvente al ambiente y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en la atmósfera. El oxígeno disuelto que constituye el 21 % de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los detectores de fluorescencia y electroquímicos. El nitrógeno disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de HPLC y cuando el solvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El dióxido de carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de solvente.

A continuación se mencionaran algunos métodos para eliminar o disminuir la presencia de partículas y gases disueltos en la fase móvil.

- a) Existen dos métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de las fases móviles:

Filtro a la entrada del solvente

Este tipo de filtro usualmente se construye de acero inoxidable u otra aleación resistente a la corrosión y se sitúa dentro de la botella del depósito del solvente

(depósito de la fase móvil) donde se une a la entrada de la presión. El filtro tiene un poro medio se clasifica según su tamaño, que usualmente van de 1 a 5 micras.

Filtración al vacío

Este aparato consta de un embudo de vidrio colocado encima de un frasco. Se aplica vacío al frasco y el solvente se filtra cuando pasa por un disco de membrana colocado en el filtro. Este sistema tiene la ventaja de poder usar membranas que tienen mucha mejor definición en el poro, se pueden tener hasta 0.2 micras, que permiten retener la mayoría de materia del ambiente del laboratorio.

- b) Existen tres métodos comunes usados para desgasificar las fases móviles previas a su uso:

Sonicar

Se utiliza un baño de ultrasonido, donde se coloca la fase móvil a sonicar por algunos minutos, los solventes en consecuencia de esto, convierten gases disueltos en burbujas diminutas, que flotan a la superficie del solvente y se eliminan. El grado de desgasificación dependerá del tamaño del baño del ultrasonido, tipo y volumen del solvente.

Helio Sparging

En este método se hace burbujear gas de helio de alta pureza en el depósito del solvente, el helio desplaza los gases disueltos en el solvente. Es un método que tiene la desventaja de ser un tanto caro. Burbujear gas helio en algunas mezclas de solventes puede causar evaporación selectiva de los solventes más volátiles y esto también es una desventaja.

Desgasificación electrónica en línea de flujo

En este método, la unidad de desgasificación se sitúa entre el depósito del solvente y la entrada a la bomba de HPLC. El flujo del solvente del depósito entra en contacto con una membrana fluoropolimérica que deja difundir los gases disueltos por la membrana en una cámara al vacío. Este método es muy conveniente y ofrece una desgasificación continua del solvente.

2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (6, 7, 8,13, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 29)

De acuerdo con NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, la PROY-NOM-164-SSA1-2005 Buenas prácticas de fabricación para fármacos y la NOM-073-SSA1-2005 Estabilidad de fármacos y medicamentos definen el término de validación como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. También se establece que se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de que no se encuentren en la FEUM o en cualquier farmacopea internacional.

Otra definición la encontramos en la Guía de validación de métodos analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. donde establece a la validación como el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analíticas deseada.

Para poderse llevar a cabo la validación debe establecerse un protocolo escrito que especifique como se llevará a cabo, deberá especificar los pasos críticos y los criterios de aceptación. Antes de su ejecución, deberá ser revisado por el responsable del proceso o sistema y aprobado finalmente por el responsable de la Unidad de Calidad y el responsable sanitario.

Los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías: Categoría I. Métodos para cuantificar a un componente específico. (contenido o potencia)

Categoría II. Métodos para la determinación de impurezas (contenido y valoración)

Categoría III. Métodos para la determinación de impurezas (límite)

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito.

2.4.1 PARÁMETROS.

Los parámetros a evaluar en la validación de un método analítico, se muestran a continuación, de acuerdo a su categoría en la siguiente tabla. (3)

Características de desempeño	CATEGORÍA			
	Contenido/ Potencia/ Valoración (I)	Pruebas de impurezas		Identificación (V)
		Contenido/ Valoración (II)	Límite (III)	
Precisión/Adecuabilidad Del Sistema	SI	SI	SI	*
Linealidad del Sistema	SI	SI	NO	NO
Especificidad	SI ²	SI	SI	SI
Exactitud y Repetibilidad	SI	SI	NO	NO
Linealidad del método	SI	SI	NO	NO
Precisión del método o Precisión Intermedia ¹	SI	SI	NO	NO
Estabilidad analítica de La muestra ¹	*	*	NO	NO
Límite de detección	NO	NO	SI	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	NO
Robustez	*	*	*	NO
Tolerancia	*	*	*	NO

*Puede ser necesario dependiendo de la naturaleza del método.

Tabla (3) Parámetros a considerar en un método analítico de acuerdo a su categoría.

1. También definido como estudio de tolerancia
2. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestras

De acuerdo a la tabla anterior el método a validar quedaría en la categoría I, y las características de desempeño a evaluar son las siguientes:

2.4.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA.

La precisión de un método analítico expresa la cercanía entre la serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de una muestra homogénea bajo las mismas condiciones preestablecidas, en este caso se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

Criterio:

C.V.: menor o igual a 1.5%

2.4.1.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Es la estabilidad que tiene un método analítico (dentro de un determinado rango) para obtener resultados directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

Criterio:

r^2 : mayor o igual 0.98

IC (β_1): no debe incluir el cero

2.4.1.3 ESPECIFICIDAD.

Es la capacidad de un método analítico para detectar de manera inequívoca un analito en presencia de otros componentes que pudieran estar presentes en la muestra, típicamente estos son productos de degradación e impurezas.

Para método indicador de estabilidad, si se disponen de los productos de degradación preparar muestras con placebo adicionado y si no es así, las muestras que contiene el analito debe someterse a condiciones que generen su inestabilidad química (luz, calor, humedad, hidrólisis ácido-básica y oxidación) y aplicar el método a las muestra resultante.

Criterio:

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito

2.4.1.4 EXACTITUD DEL MÉTODO.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía entre los valores obtenidos y los que son aceptados de manera convencional como un valor verdadero o referente aceptado y el valor hallado.

Se determina de cuando menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista

Criterio:

El por ciento recuperado y el coeficiente de variación deberán de estar de acuerdo con la Tabla (4).

Método	Porcentaje de recobro	CV
Cromatográficos	98-102%	Igual o menor al 2%
El(IC _μ) debe incluir el 100 % ò que incluya el intervalo 98 AL 102 %		

Tabla (4). Criterios de aceptación de la exactitud

2.4.1.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Los criterios de aceptación deberán estar acorde a la siguiente Tabla (5):

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada	
r^2	≥ 0.98
El IC (β_1)	debe incluir la unidad
El IC (β_0)	debe incluir el cero
El IC _μ	debe estar entre 98 – 102 %
El CV del porcentaje de recobro	No debe ser > 2% si el método es cromatográfico

Tabla (5) Criterios de aceptación de linealidad del método

2.4.1.6 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Se recomienda analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % o una muestra homogénea cuyo contenido esté incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad del método, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes.

Criterio:
El $CV \leq 2 \%$

2.4.1.7 ROBUSTEZ.

Es la capacidad que posee un procedimiento analítico para permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones de los parámetros en el método, lo cual proporciona un indicativo de su utilidad en condiciones normales de operación.

2.4.1.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Es la 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.

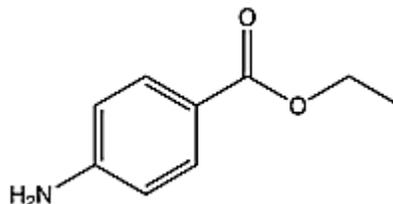
Criterios

La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$) deberá ser $\leq 2 \%$

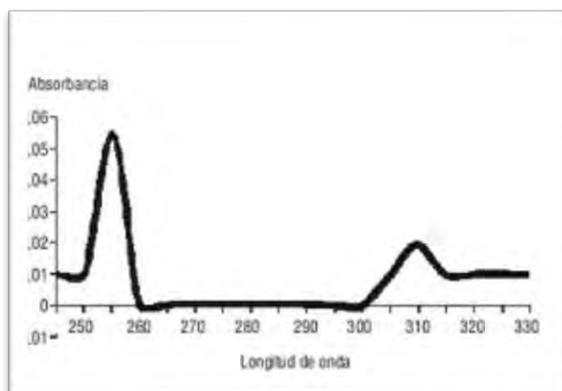
2.5 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS FÁRMACOS EN ESTUDIO

2.5.1 BENZOCAÍNA ^(3,20, 30)

- Sinónimos: Aminobenzoato de etilo, 4-aminobenzoato de etilo, p-aminobenzoato de etili, anestamina, anestesia, cocainol, etilaminobenzoato, etoformo, eufagina, ortesina y paratesina.
- Fórmula desarrollada



- Fórmula condensada
 $C_9H_{11}NO_2$
- Peso molecular
165.19 g/mol
- Solubilidad
Muy soluble en agua, soluble en alcohol, cloroformo y éter
- Absorción Ultravioleta
Solución 5µg/mL
Medio: Cloroformo. Absorción a 255 nm



Espectro UV

- Punto de fusión
88 - 92 °C
- pKa
2.5
- Propiedades Fisicoquímicas
Polvo cristalino blanco o cristales incoloros
- Propiedades y aplicaciones

La Benzocaína es el éster etílico del ácido p-aminobenzoico .Es un anestésico local de tipo éster, con una baja toxicidad sistémica, que actúa bloqueando los receptores sensoriales de las membranas mucosas a nivel local, utilizado a menudo en combinación con otras sustancias, cómo analgésicos, antisépticos, antibacterianos, antifúngicos y antipruríticos.

Se obtiene principalmente, mediante la reacción de esterificación con etanol del ácido p-aminobenzoico en medio ácido.

La acción anestésica comienza a los 30 - 60 segundos y dura 5 - 10 minutos. La acción anestésica local es ejercida por medio de la Benzocaína, estabilizando la membrana de la neurona, por inhibición del flujo iónico requerido para la iniciación y transmisión del impulso nervioso.

La Benzocaína estabiliza la membrana neuronal por inhibición del flujo iónico requerido para la iniciación y conducción de los impulsos, realizando de este modo la acción anestésica local. La Benzocaína suministra anestesia sumamente rápida, pero de corta duración 5 a 10 minutos. La Benzocaína es de acción corta, por ello no se la usa como inyectable si no en forma tópica a nivel de mucosas pero no en la piel, no es hidrosoluble, posee una concentración mayor que los inyectables, un 4% y consecuentemente se absorbe más en la sangre.

Puede ser el anestésico de elección de las personas adultos mayores y niños, para alivio temporal del dolor e irritación de la mucosa oral causado por placas o puentes desajustados. También se usa para disminuir el dolor en la aplicación de otro anestésico local. Para el tratamiento del dolor en extracciones dentales, dentición, afecciones gingivales, de la mucosa oral, de garganta y de oído, hemorroides y prurito anal y vaginal, quemaduras leves y quemaduras solares, prurito por plantas y en dolor muscular por tirones, torceduras y anestesia local de boca se utiliza en concentraciones en aplicaciones tópicas al 10 o 20 % en las caries y alrededor de las encías.

En la dosificación que se emplea en odontología es completamente atóxica y difícilmente se presentan reacciones alérgicas.

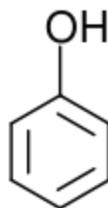
En la terapia del dolor de garganta, se vehiculiza en pastillas para disolver en la boca, además se emplean pastillas, spray y geles con elevadas dosificaciones para la anestesia local de boca y garganta. En dolor de oídos se usa en forma de gotas.

Precauciones y contraindicaciones:

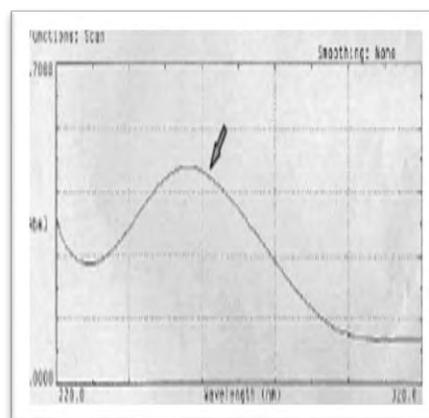
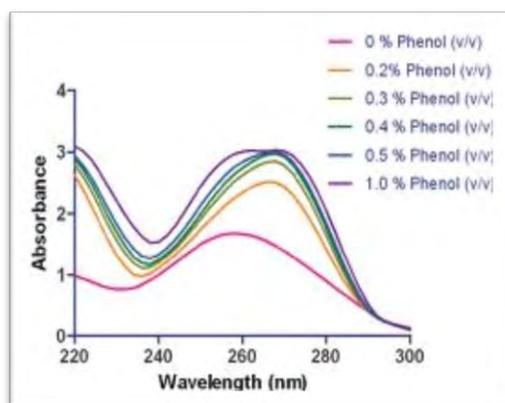
A excesivas dosis se producen: altas concentraciones en plasma, depresión del sistema cardiovascular (hipotensión, latido cardiaco lento o irregular, palidez inusual, transpiración incrementada). Puede llevar a paro cardiaco; toxicidad del sistema nervioso central (visión doble o borrosa, confusión, convulsión, mareo o aturdimiento, sensación de calor, frío, escalofríos, ansiedad, excitación, nerviosismo o inquietud).

Los efectos adversos son en general leves y transitorios, pudiendo ocasionar raramente sensación de quemazón. A dosis altas por vía oral puede producir excitación, náuseas, vómitos, dilatación pupila, pulso rápido, convulsiones, etc. La Benzocaína se hidroliza en el cuerpo a ácido p-aminobenzoico (PABA), que inhibe la acción de las sulfamidas, por lo que no debe administrarse en niños cuando se encuentren en tratamientos con sulfamidas. La DL_{50} de la benzocaína vía oral en ratón es 216 mg/Kg.

2.5.2 FENOL ^(3,28)



- Fórmula condensada
C₆H₆O
- Peso molecular
94.1 g/ mol
- Solubilidad:
Muy soluble en alcohol, glicerol, cloroformo, éter dietílico y soluble en agua
- Absorción Ultravioleta
Solución 5µg/mL
Medio: Etanol. Absorción a 218nm



Espectros UV en cloroformo

- Temperatura de fusión.
41 °C
- Temperatura de congelación.
42 °C
- Temperatura de ebullición
181.75 °C
- pKa
10
- Propiedades y aplicaciones

El fenol al 90% es utilizado en la manufactura de resinas fenólicas y epoxicas, ácido pícrico, explosivos, fertilizantes, desinfectante e insecticidas. Es utilizado principalmente como un conservador antimicrobial en productos farmacéuticos parenterales, aunque también puede ser utilizado en formulaciones farmacéuticas tópicas. Desinfectante (5%), conservador e inyectables (0.5%), anestésico local (0.5%-1.0%) enjuagues (1.4%).

El fenol es un alcohol aromático con las propiedades de un ácido débil (tiene un H lábil, que es responsable de su carácter ácido). Su estructura tridimensional tiende a retener el ion H^+ del grupo hidroxilo a través del llamado efecto mesomérico. Algunas veces se llama ácido carbónico cuando está presente en solución acuosa. Reacciona con bases fuertes para formar las sales llamadas fenolatos. Los fenoles son más ácidos que el alcohol debido al núcleo aromático que cede a una deslocalización de la carga negativa del anión fenolato.

El fenol fue obtenido por Ruge en 1834; separó del asfalto lo que él llamó ácido carbónico. Nombre con el que se conoció hasta principios del siglo pasado. En 1914 Meyers y Bergius, proponen hidrolizar el monoclorobenceno con hidróxido de sodio. Proceso que se generalizó pocos años después.

En 1961, se busca reformar los procesos de obtención del fenol, y debido a esto, la Dow Chemical of Canada, Ltd., lo obtiene por medio de la oxidación del tolueno hasta ácido benzoico, y la reoxidación de éste para obtener fenol.

Toxicidad en seres humanos/mamíferos:

Los vapores y líquidos del fenol son tóxicos y pueden ingresar fácilmente al cuerpo por vía cutánea. Los vapores inhalados lesionan las vías respiratorias y el pulmón. El contacto del líquido con la piel y los ojos produce severas quemaduras (el fenol es un poderoso tóxico protoplasmático). La exposición prolongada paraliza el sistema nervioso central y produce lesiones renales y pulmonares. La parálisis puede desembocar en la muerte. Los síntomas que acompañan la afección son cefalalgias, zumbido en los oídos, mareos, trastornos gastrointestinales, obnubilación, colapso, intoxicación, pérdida del conocimiento, respiración irregular, paro respiratorio (apnea), paro cardíaco y, en algunos casos, convulsiones. El DL_{50} en ratas es de 414-530 mg/kg oral.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los progresos en ciencia, tecnología y el constante crecimiento poblacional han llevado al desarrollo de nuevos productos. Esto a su vez hace crecer la necesidad de disponer de métodos para la determinación de compuestos activos, a fin de poder asegurar la identidad, efectividad, potencia, inocuidad y pureza de los productos hasta el momento de su uso. Estos métodos muchas veces no se encuentran publicados en las obras oficiales que generalmente se consultan, debido a esto se hace necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis en el laboratorio. De acuerdo a las Normas Oficiales Nacionales; NOM-059, NOM164 Y NOM-073, establecen que los métodos de análisis, en caso de no aparecer en la FEUM o en cualquier farmacopea internacional, deberán de ser validados.

En la planta piloto de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza campus II, se desarrolló una formulación magistral de un enjuague bucal de encino, como formulación nueva se desconoce su tiempo de vida útil, y las condiciones de almacenaje que debe tener. Para ello se realizara un estudio de estabilidad, en el cual se llevaran a cabo una serie controles de calidad de la formulación, entre los que se incluye la valoración de los principios activos. Debido a que no existen métodos de valoración registrados en FEUM 9ª edición, ni tampoco en farmacopeas internacionales, surge la necesidad de desarrollar una nueva técnica de análisis en laboratorio para separar y cuantificar Fenol y Benzocaína, dos de los principios activos de la formulación.

Para desarrollar una técnica de cuantificación es necesario en primer lugar, establecer el método analítico más conveniente a ser utilizado. Para esto se debe conocer la naturaleza fisicoquímica de los principios activos y las propiedades de la formulación.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación, cuantificación de compuestos químicos, y posee una alta sensibilidad. Por ser una técnica desarrollada, debe ser validada y además demostrar que es indicativa de estabilidad, una vez que cumpla con los parámetros de validación requeridos, podrá ser utilizado para obtener información del comportamiento de enjuague bucal sometido a un estudio de estabilidad.

4. OBJETIVOS

Objetivo General: Desarrollar y validar un método analítico indicativo de estabilidad de dos de los componentes activos más importantes: Benzocaína y Fenol, en la formulación magistral de un enjuague bucal.

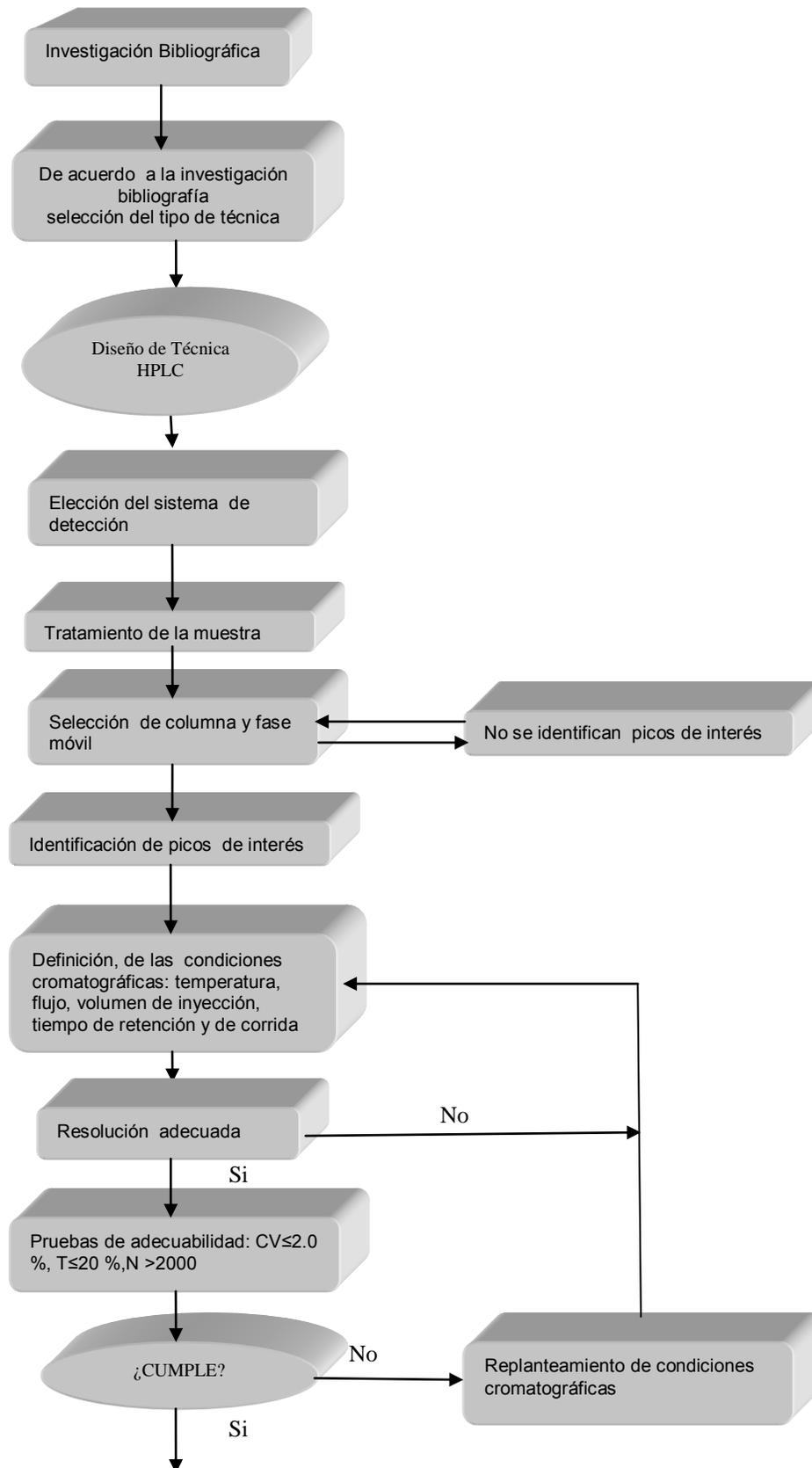
Objetivos Particulares:

- 1) Desarrollar una técnica de análisis capaz de cuantificar dos de los principios activos de la formulación
- 2) Demostrar mediante la validación la confiabilidad del nuevo método

5. HIPÓTESIS

De acuerdo a una investigación bibliográfica sobre el comportamiento fisicoquímico del Fenol y la Benzocaína se propondrá y se desarrollara una metodología por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, si esta cumple satisfactoriamente con los parámetros de desempeño de la validación es decir si es lineal, exacto, preciso, reproducible y específico entonces se podrá asegurar su consistencia durante su uso en un estudio de estabilidad.

6. DIAGRAMA DE FLUJO



CONTINUACIÓN DEL DIAGRAMA

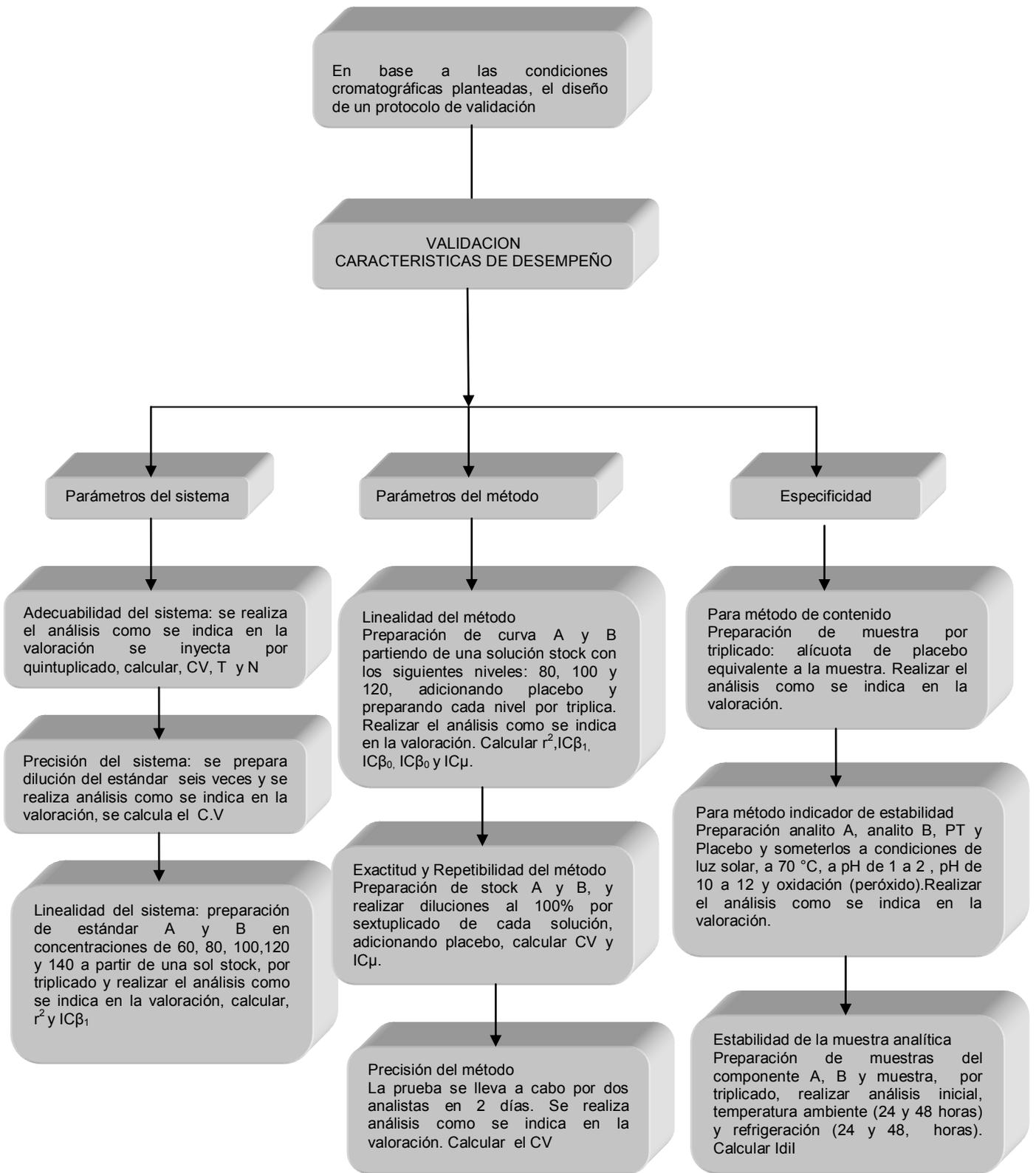


Figura (5) Diagrama de flujo

7. METODOLOGÍA

7.1 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

A. MATERIALES

1. REACTIVOS

- Ácido fosfórico
- Metanol HPLC
- Agua HPLC

2. EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos, Modelo 1200, Detector UV-Visible
- Balanza analítica Mettler Toledo, Modelo: AX26DR
- Sonicator marca Misonix, modelo 3510R-MHT

3. MATERIAL:

- Columna: Metachem C18, 4 X 250 mm, 5 μ m
- Columna: Metachem C18, 4 X 100 mm, 5 μ m
- Columna: Metachem C18, 4 X 50 mm, 5 μ m
- Pipetas volumétricas de 1,2,5 y 10 mL
- Matraces volumétricos de 25,50 y 100 mL
- Probeta de 500 mL
- Reservorio de 1000 mL
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL

B. METODOLOGÍA

Se realizó una investigación bibliográfica y virtual no encontrándose ningún antecedente publicado de una técnica de análisis que contuviera la asociación de los principios activos de fenol y benzocaína.

Los estándares usados fueron materias primas estandarizadas con métodos volumétricos.

1.- En base a la investigación bibliográfica sobre el comportamiento fisicoquímico de los principios activos en estudio se eligió el sistema de detección por absorción ultravioleta a 218 nm.

2.- Se seleccionó el tipo de columna cromatográfica (no polar) en base a las características de los componentes (polares) y a la disponibilidad con la que se contaba en el laboratorio. Se seleccionó a partir de tres opciones:

- Columna:Metachem C18, 4 X 50 mm, 5 μ m
- Columna:Metachem C18, 4 X 100 mm, 5 μ m
- Columna:Metachem C18, 4 X 250 mm, 5 μ m

3.- Debido a que los principios activos son de naturaleza polar, se seleccionó la fase móvil, compuesta por un solvente polar (metanol), dado que el fenol y la benzocaína son sustancias parcialmente ionizadas a los valores neutros de pH característicos de las fases móviles usuales, se utilizó ácido fosfórico al 0.1 %, esto con el fin de aumentar la ionización y por ende la retención de las sustancias en el sistema de fase reversa.

- Metanol: Ácido fosfórico al 0.1 %,

4.- De acuerdo a la solubilidad de los componentes, se prepararon las siguientes soluciones, con los estándares de los componentes:

- Fenol: 100 µg / mL en metanol-agua 1:1
- Benzocaína: 100 µg / mL en metanol

5.- Se realizaron varias inyecciones de 20 µL de las anteriores soluciones comenzando con la primera columna (Metachem C18, 4 X 50 mm, 5 µ), bajo diferentes proporciones de la fase móvil, comenzando por 50:50 de metanol-ac. Fosfórico al 0.1 %, y moviendo las proporciones de los solventes de acuerdo a las respuestas obtenidas, con un flujo de entre 0.5 a 1.5 mL / minuto y con un detector de UV. Se realizó lo mismo con las dos restantes columnas.

6.- De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó la columna y la proporción de fase móvil.

7.- Una vez que ya se contó con la columna y la fase móvil más idónea, a través de la experimentación se optimizaron las siguientes variables, a fin de conseguir una adecuada resolución de los picos.

- Preparación de la muestra
- Longitud UV
- Temperatura
- Flujo
- Volumen de inyección
- Tiempo de Retención aproximado (TR)
- Tiempo de Corrida

8.- En base a los resultados encontrados durante la experimentación, se diseñó el método

9.- Se realizó una prueba de adecuabilidad.

- Se realizaron seis inyecciones de las soluciones de referencia de Benzocaína y Fenol.
- Se realizó el análisis como se indica en la valoración (páginas 63 y 64)

10.- Los valores encontrados en la prueba de adecuabilidad estuvieron dentro de los siguientes criterios de aceptación:

- Coeficiente de Variación (CV): $\leq 2.0 \%$
- Factor de coleo (T): $\leq 20 \%$
- Número de Platos Teóricos (N): > 2000

De acuerdo a lo anterior no fue necesario replantearse nuevamente las variables cromatograficas del método y por lo tanto se decidió a dar inicio a la validación

7.2 METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

7.2.1 PARÁMETROS:

En el estudio de validación se determinaron los siguientes parámetros de acuerdo al método analítico desarrollado para los principios activos.

7.2.2 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada (página 63 y 64)

- Se inyectaron siete veces los estándares
- Se realizó el análisis como se indica en la metodología planteada
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (7)

Criterio de aceptación	
Coefficiente de variación (CV)	$\leq 2\%$
Factor de Coleo (T)	$\leq 2.0 \%$
Número de Platos Teóricos (N)	> 2000

TABLA (7) Criterios de aceptación de adecuabilidad

7.2.3 PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada

- Se preparó la segunda dilución de las soluciones estándar, seis veces.
- Se realizó el análisis como se indica en la metodología planteada.

- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (8)

Criterio de aceptación	
Coefficiente de variación (CV)	$\leq 1.5 \%$

Tabla (8) Criterios de aceptación de precisión del sistema

7.2.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR FENOL: Se pesaron 15 mg de estándar secundario de componente Fenol, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y aforaron con diluyente, y se mezclaron. Se tomaron alícuotas de 3, 4, 5, 6, 7 mL y se depositaron en matraces volumétricos de 100 mL y se aforaron con diluyente. Tabla (9)

Alícuota (mL)	Concentración	
	$\mu\text{g} / \text{mL}$	%
3	4.5	60.0
4	6.0	80.0
5	7.5	100.0
6	9.0	120.0
7	10.5	140.0

Tabla (9) Curva de linealidad del sistema de Fenol

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE BENZOCAÍNA: Se pesaron 50 mg de estándar secundario de benzocaína y se colocaron en un matraz volumétrico de 250 mL, se disolvieron con 2 mL de metanol, se diluyeron y aforaron con diluyente, se mezclaron. Se tomaron alícuotas de 6, 8, 10, 12, 14 mL y se depositaron en matraces volumétricos de 25 mL, y se aforaron con diluyente. Tabla (10)

Alícuota (mL)	Concentración	
	µg / mL	%
6	48	60.0
8	64	80.0
10	80	100.0
12	96	120.0
14	112	140.0

Tabla (10) Curva de linealidad del sistema de Benzocaína

- Se realizó por triplicado cada nivel
- Se realizó el análisis como se indica en la metodología planteada.
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (11)

Criterios de aceptación	
Coefficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98
Intervalo de Confianza ($IC\beta_1$)	No debe incluir el cero

Tabla (11) Criterios de aceptación para la linealidad del sistema

7.2.5 ESPECIFICIDAD.

7.2.5.1 PARA MÉTODO DE CONTENIDO.

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada

PREPARACION DEL PLACEBO: Este se preparó de acuerdo a la formulación original del enjuague bucal, excluyendo a los dos componentes activos (Fenol y Benzocaína) que se cuantificaron.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: Se colocó una alícuota equivalente a 2 mL de placebo en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 25 mL de diluyente y se sónico por 10 minutos, se aforo con diluyente y se mezcló.

- Se preparó la muestra por triplicado
- Se realizó el análisis como se indica en la metodología planteada.
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (12)

Criterio de aceptación
La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

Tabla (12) Criterios de aceptación de la especificidad

7.2.5.2 PARA MÉTODO INDICADOR DE ESTABILIDAD

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada

Se sometieron a las siguientes condiciones, los analitos, la muestra de producto terminado, y el placebo:

- 1 mL de peróxido de hidrógeno durante una semana
- Temperatura de 70° C durante 5 horas en baño maría.
- Luz UV durante 24 horas
- pH 1-2 durante una semana
- pH 10-12 durante una semana

PREPARACIÓN DEL ANÁLITO FENOL: Se pesaron 15 mg de estándar secundario de Fenol, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y aforaron con diluyente y se mezclaron. Se colocó una alícuota de 5 mL en un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con diluyente (Concentración = 7.5µg / mL). Se preparó por duplicado.

PREPARACIÓN DEL ANÁLITO BENZOCAÍNA: Se pesaron 20 mg de estándar secundario de Benzocaína, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y aforaron con diluyente, y se mezclaron. Se colocó una alícuota de 10 mL en un matraz volumétrico de 25 mL, se mezclaron y aforaron con diluyente. (Concentración = 80 µg / mL).

PREPARACIÓN DEL LA MUESTRA DE PRODUCTO TERMINADO: Se colocó una alícuota de 2 mL, equivalente a 0.36 mg de Fenol y 4 mg de Benzocaína en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 25 mL de diluyente, se sonicó por 10 minutos, se aforó con diluyente y se mezcló. (Concentración = 7.2 µg / mL de Fenol y 80 µg de Benzocaína).

PREPARACIÓN DEL PLACEBO: Se colocó una alícuota de 2 mL de placebo en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionó 25 mL de diluyente, se sónico 10 minutos, se aforó con diluyente y se mezcló.

- Se preparó cada muestra una vez.
- Se realizó el análisis como se indica en la metodología planteada.
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (13)

Criterio de aceptación
La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito de interés

Tabla (13) Criterio de aceptación para la especificidad

7.2.6 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE FENOL: Se pesaron 15 mg de estándar secundario de Fenol, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y aforaron con diluyente, y se mezclaron. Se colocaron alícuotas de 5 mL

en 6 matraces volumétricos de 100 mL se adicionaron 4 mL de placebo a cada uno de los matraces y se aforaron con diluyente (Concentración = 7.5 µg / mL).

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK BENZOCAÍNA: Se pesaron 20 mg de estándar secundario de Benzocaína, y se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y aforaron con diluyente. Se colocaron alícuotas de 10 mL en 6 matraces volumétricos de 25mL y se adicionó 1 mL de placebo a cada uno de los matraces y se aforaron con diluyente (Concentración = 80 µg / mL).

- Se prepararon las muestras seis veces.
- Se realizó el análisis como se indica en la metodología planteada.
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (14)

Criterio de aceptación	
Intervalo de Confianza (ICµ)	98 – 102%
Coefficiente de variación (CV)	≤ 2%

Tabla (14) Exactitud y repetibilidad del método

7.2.7 LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE FENOL: Se pesaron 15 mg de estándar secundario de Fenol, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y aforaron con diluyente.

Se adicionó a matraces de 100 mL los siguientes mililitros de solución stock y 4 mL de placebo, se disolvieron y aforaron con diluyente. Tabla (15)

mL adicionados	mg adicionados	Concentración	
		mg / mL	%
4	0.6	0.006	80.0
5	0.75	0.0075	100.0
6	0.9	0.009	120.0

Tabla (15) Concentraciones de la curva de linealidad del método de Fenol

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK BENZOCAÍNA: Se pesaron 20 mg de estándar secundario de Benzocaína, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y aforaron con diluyente.

Se adicionaron a matraces de 25 mL los siguientes mililitros de solución stock y 1 mL de placebo, se mezcló y aforar con diluyente. Tabla (16)

mL adicionados	mg adicionados	Concentración	
		mg / mL	%
8	1.6	0.064	80.0
10	2.0	0.080	100.0
12	2.4	0.096	120.0

Tabla (16) Concentraciones de la curva de linealidad del método de Benzocaína

- Se preparó cada nivel por triplicado.
- Se realizó el análisis de acuerdo a metodología planteada.
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (17)

Criterios de aceptación	
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98
Intervalo de Confianza para la pendiente ($IC\beta_1$)	Debe incluir la unidad
Intervalo de Confianza para la ordenada al origen ($IC\beta_0$)	Debe incluir el cero
Coeficiente de Variación de regresión ($CV_{y/x}$)	≤ 2.0
Intervalo de Confianza para la media poblacional ($IC\mu$)	98 - 102%

Tabla (17) Criterios de aceptación de la linealidad del método

7.2.8 PRECISIÓN DEL MÉTODO (Precisión Intermedia o Tolerancia intermedia / analista).

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: Se colocó una alícuota de 2 mL, equivalente a 0.36 mg de Fenol y 4 mg de Benzocaína en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionó 25 mL de diluyente y se sonicó por 10 minutos, se aforó con diluyente y se mezcló. (Concentración = 7.2 μg / mL de Fenol y 80 μg de Benzocaína).

- Se realizó el análisis por 2 analistas en 2 días
- Se realizó el análisis de acuerdo a metodología planteada.
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación

Criterio de aceptación	
Coeficiente de variación (CV)	$\leq 2\%$

Tabla (18) Criterios de aceptación de la precisión del método

7.2.9 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Los estándares de Fenol y Benzocaína se prepararon de acuerdo a la metodología planteada.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: Se colocó una alícuota de 2 mL, equivalente a 0.36 mg de Fenol y 4 mg de Benzocaína en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionó 25 mL de diluyente, se sonicó por 10 minutos, se aforó con diluyente y se mezcló. (Concentración = 7.5 µg / mL de Fenol y 80 µg de Benzocaína).

- Se preparó cada muestra por triplicado.
- Se fraccionó cada muestra para realizar el análisis inicial, temperatura ambiente (24 y 48 horas) y refrigeración (24 y 48 horas).
- Se analizaron las muestras correspondientes con estándar recién preparado.
- Se realizó el análisis de acuerdo a metodología planteada.
- Los resultados se evaluaron de acuerdo a los siguientes criterios de aceptación. Tabla (19)

Criterio de aceptación	
Diferencia absoluta de la media aritmética $ d_i $	$\leq 2\%$

Tabla (19) Estabilidad analítica de la muestra

8. RESULTADOS

8.1 MÉTODO

- **Detección del pico de Benzocaína en las siguientes condiciones:**
 - Columna: Metachem C18, 4 X 250 mm, 5 µm
 - Detector: UV a 218
 - Flujo de 1 mL/ minuto
 - Volumen de Inyección: 40 µL
 - Tiempo de retención: 11.45 minutos
 - Fase Movil : Metanol : Ac. Fósfórico al 0.1 % (50:50)
 - Diluyente: Metanol

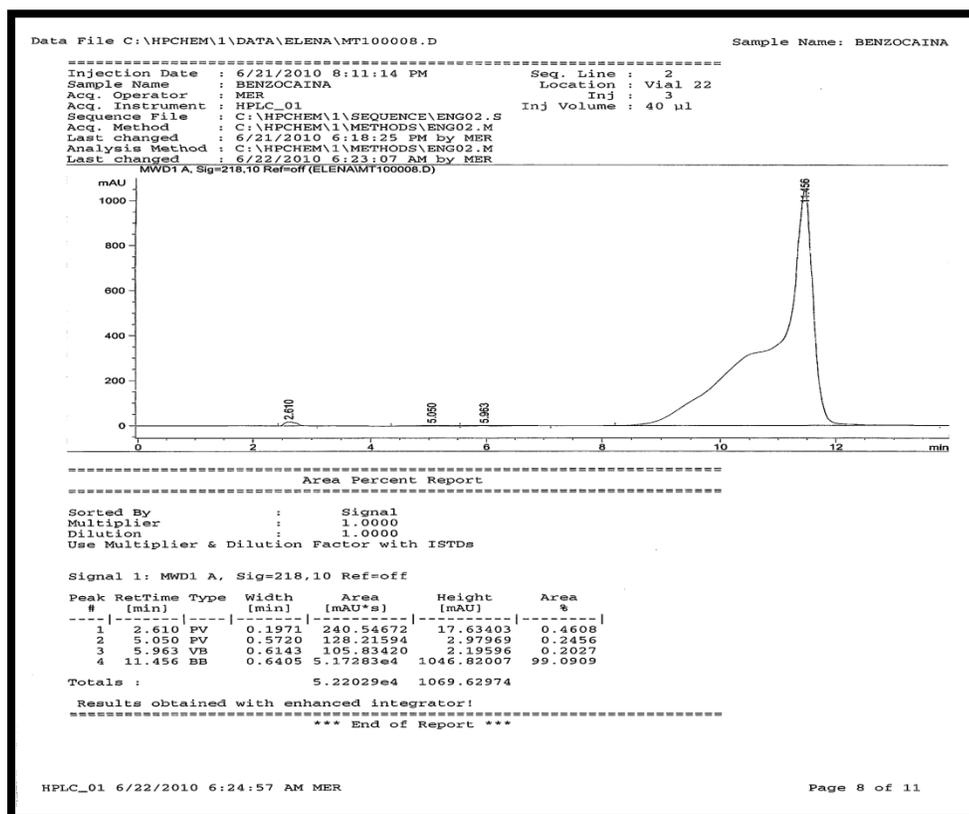


FIGURA (6) Cromatograma de las primeras respuestas de la Benzocaína

- **Detección del pico de Fenol en las siguientes condiciones:**

- Columna: Metachem C18, 4 X 250 mm, 5 µm
- Detector: UV a 218
- Flujo de 1 mL/ minuto
- Volumen de Inyección: 40 µL
- Tiempo de retención: 7.9 minutos
- Fase Movil : Metanol : Ac. Fósfórico al 0.1 % (50:50)
- Diluyente: Metanol

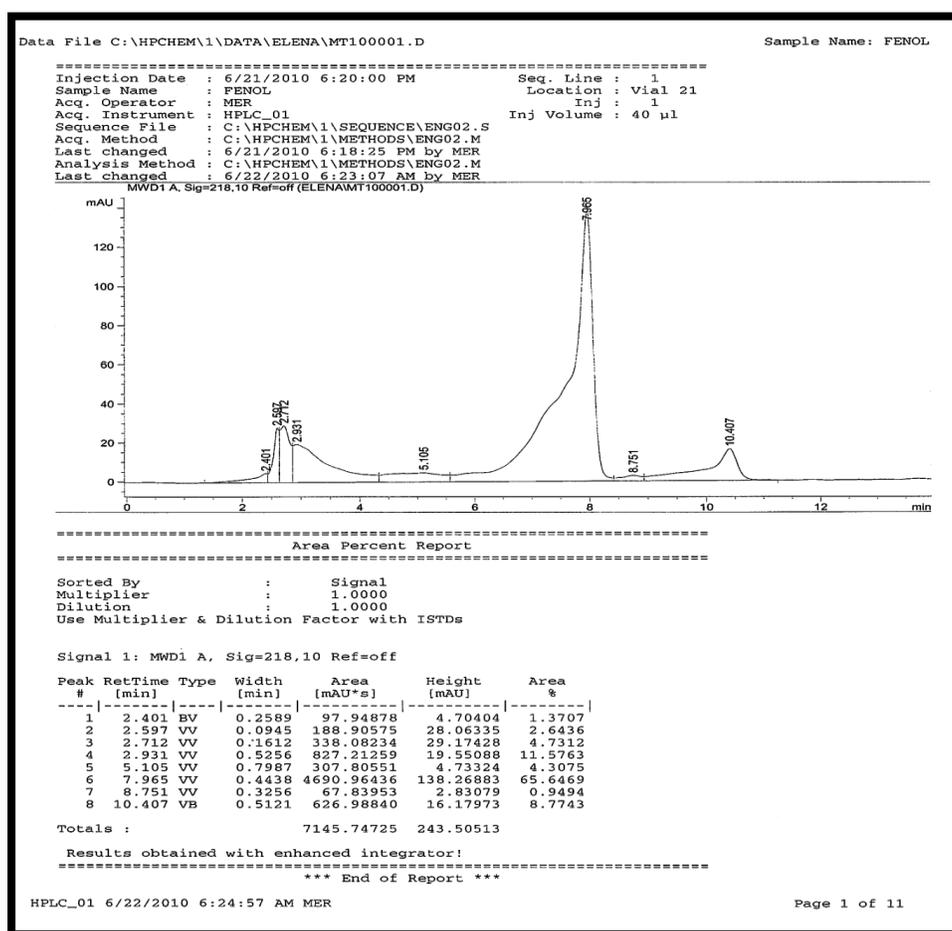


FIGURA (7) Cromatograma de las primeras respuestas del Fenol

- Optimización del pico de Benzocaína de acuerdo al ajuste de los siguientes parámetros:
 - Proporciones de la fase móvil
 - Volumen de inyección de la muestra
 - Flujo

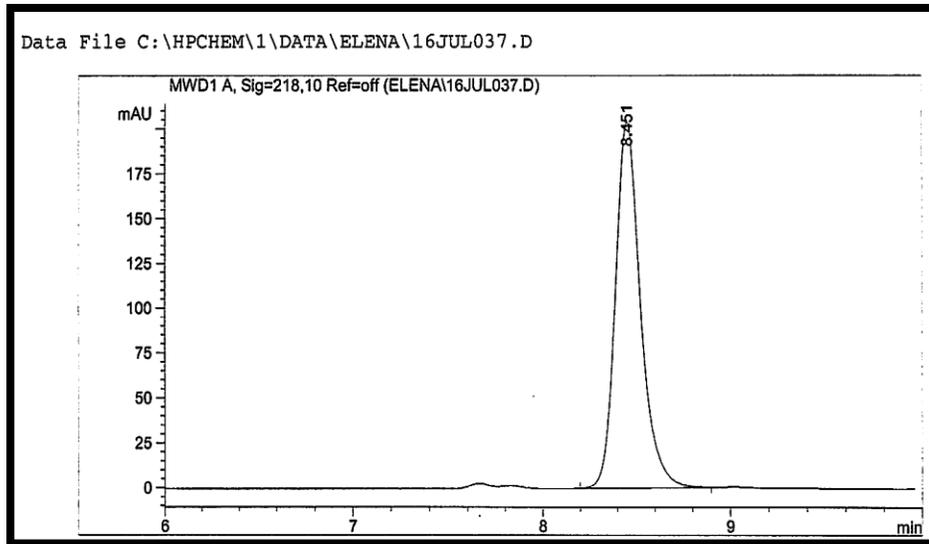


FIGURA (8) Cromatograma de Benzocaína obtenido después del ajuste de los parámetros

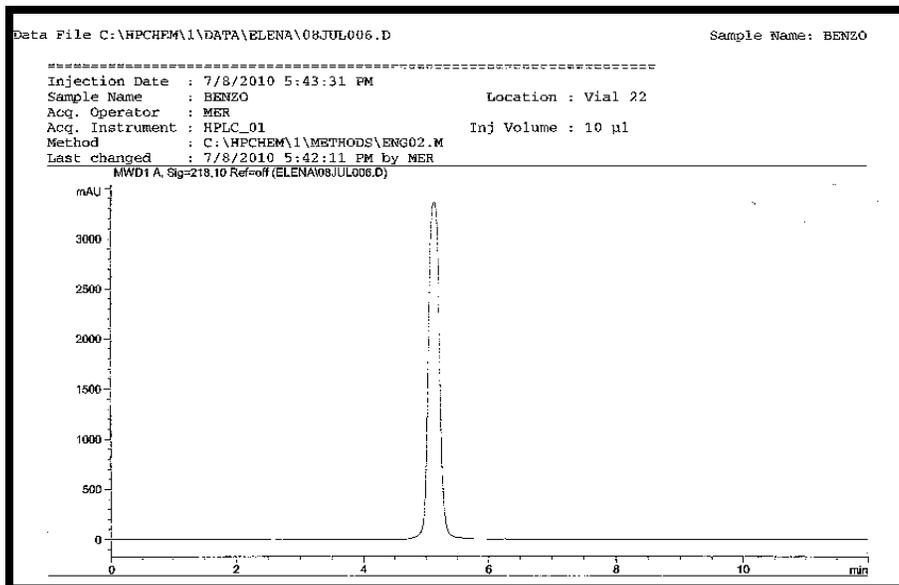


FIGURA (9) Cromatograma de Benzocaína obtenido después de definir los parámetros

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ELENA\16JUL037.D

Sample Name: ESCB1

Compound# 2 : COMPONENTE B

Amount [ng/ul]: 0.0000

Peak description [min]:

Signal: MWD1 A, Sig=218,10 Ref=off

RetTime: 8.451 k': -

Height: 203.63 Area: 1898.4

Start: 8.198 End: 8.898

Skew: 0.713 Excess: 1.532

Width at half height: 0.135

5 sigma: 0.347

tangent: 0.238

tailing: 0.337

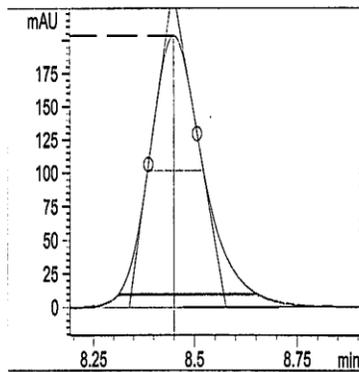
Symmetry: 0.794

USP Tailing: 1.240

Integration type: BP

Time increment [msec]: 400.0

Data points: 111



Statistical moments (BB peak detection):

M0: 1896.2

M1: 8.465

M2: 0.005094

M3: 0.000259

M4: 0.000118

Tangent method

Halfwidth method

5 sigma method

Statistical

Efficiency: Plates per ..

column meter

20191 -

21709 -

14856 -

14068 -

Relationship to preceding peak:

Resolution Tangent method: -

Halfwidth method -

Selectivity: -

5 sigma method -

Statistical method -

FIGURA (10) Cromatograma de Benzocaína obtenido después de definir los parámetros

- **Optimización del pico de Fenol de acuerdo al ajuste de los siguientes parámetros:**
 - Proporciones de la fase móvil
 - Volumen de inyección de la muestra
 - Flujo
 - Concentración de la muestra

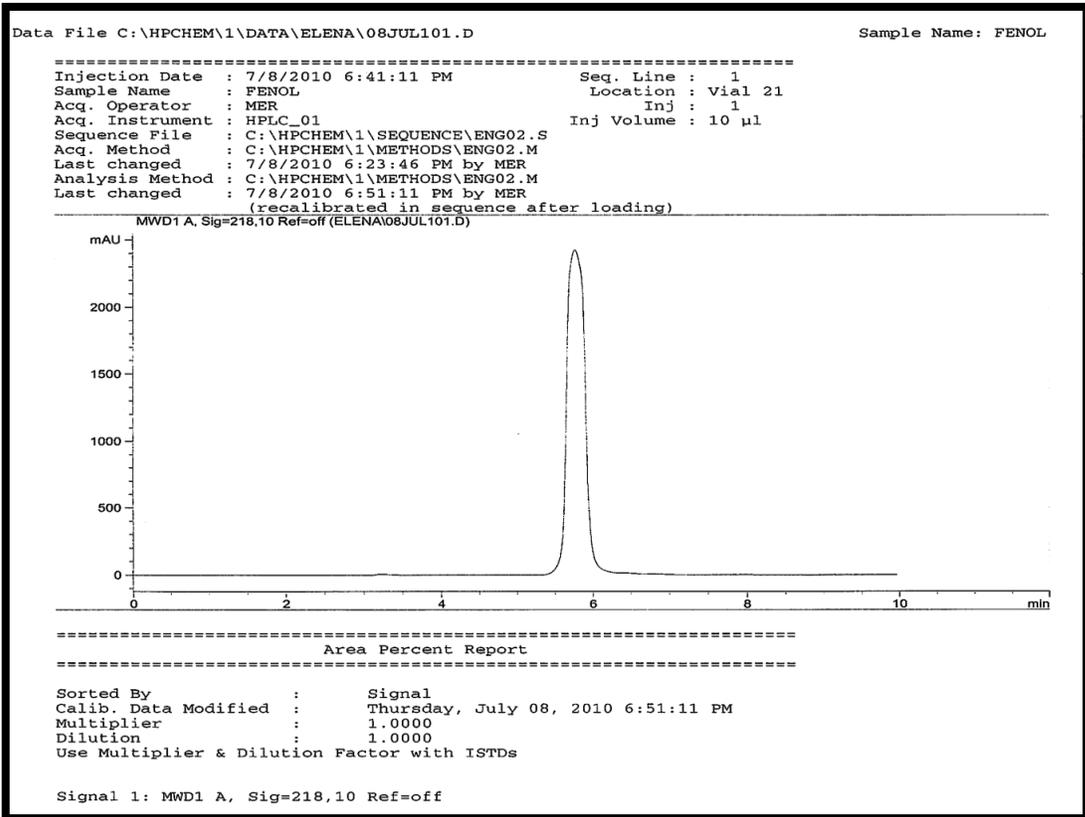


FIGURA (11) Cromatograma de Fenol obtenido después del ajuste de los parámetros

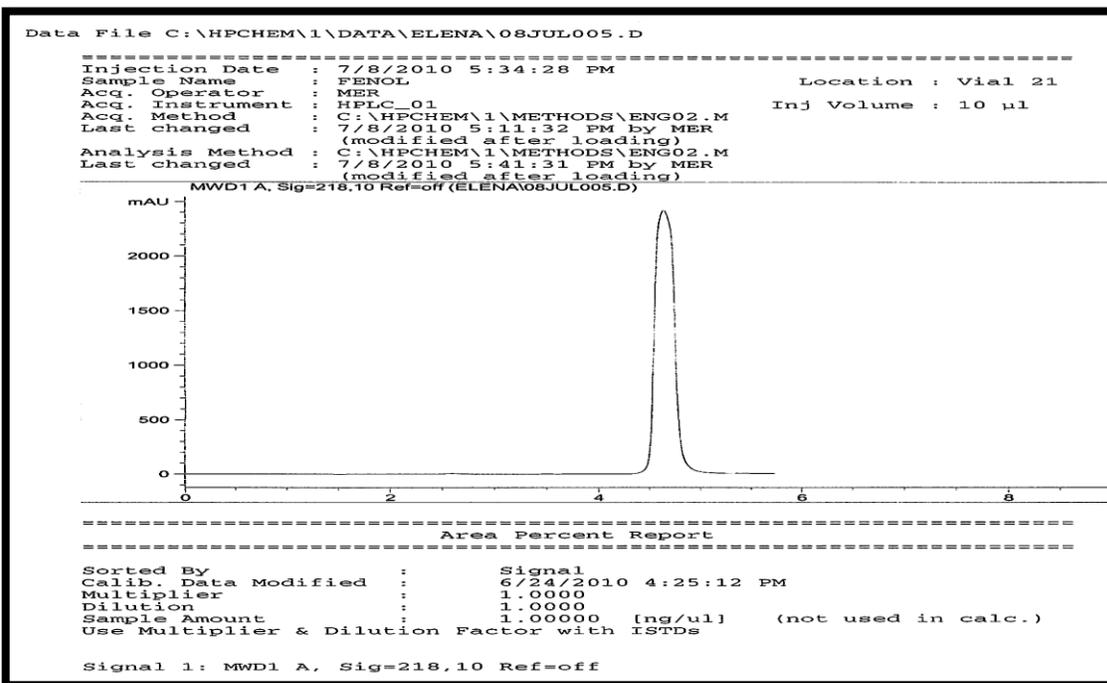


FIGURA (12) Cromatograma de Fenol obtenido después del ajuste de los parámetros

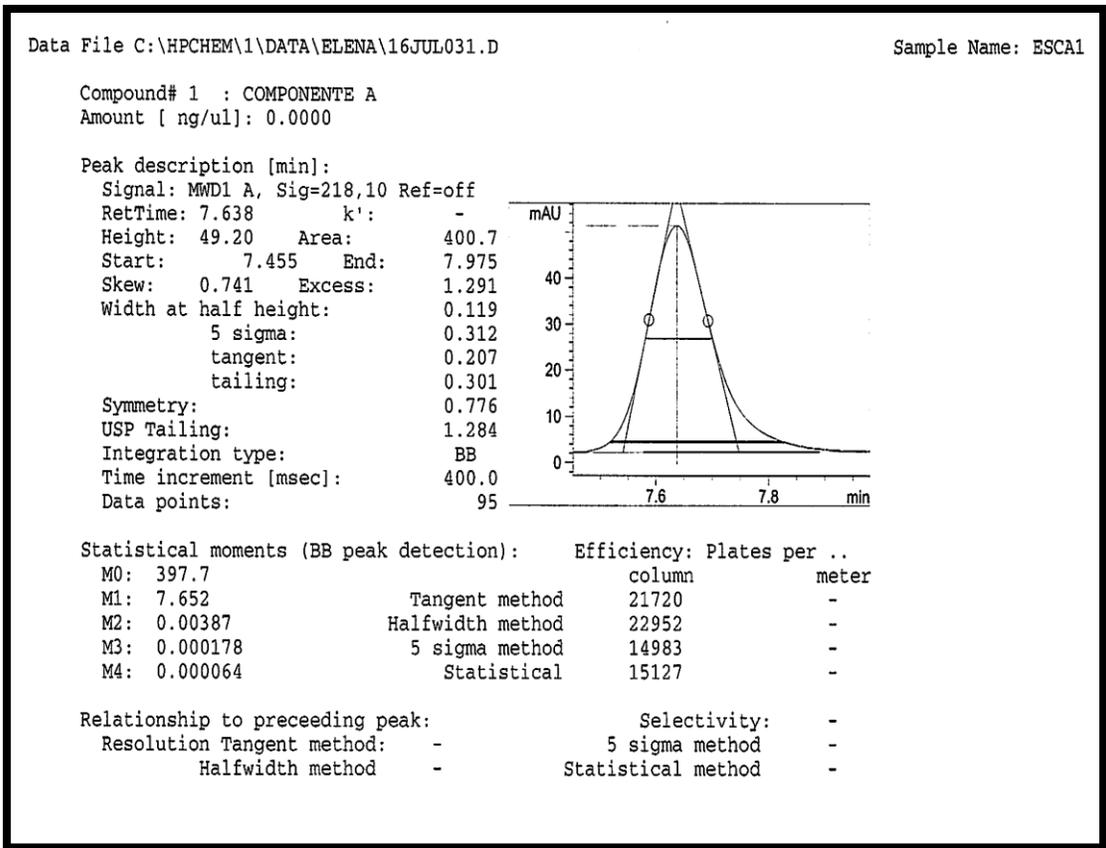


FIGURA (13) Cromatograma final de Fenol obtenido después del ajuste de los parámetros

- Mezcla de Fenol y Benzocaína, para ajustar los parámetros finales del método, como:
 - Preparación y concentración de la muestra y estándares
 - Flujo
 - Volumen de inyección
 - Tiempo de retención
 - Tiempo de corrida

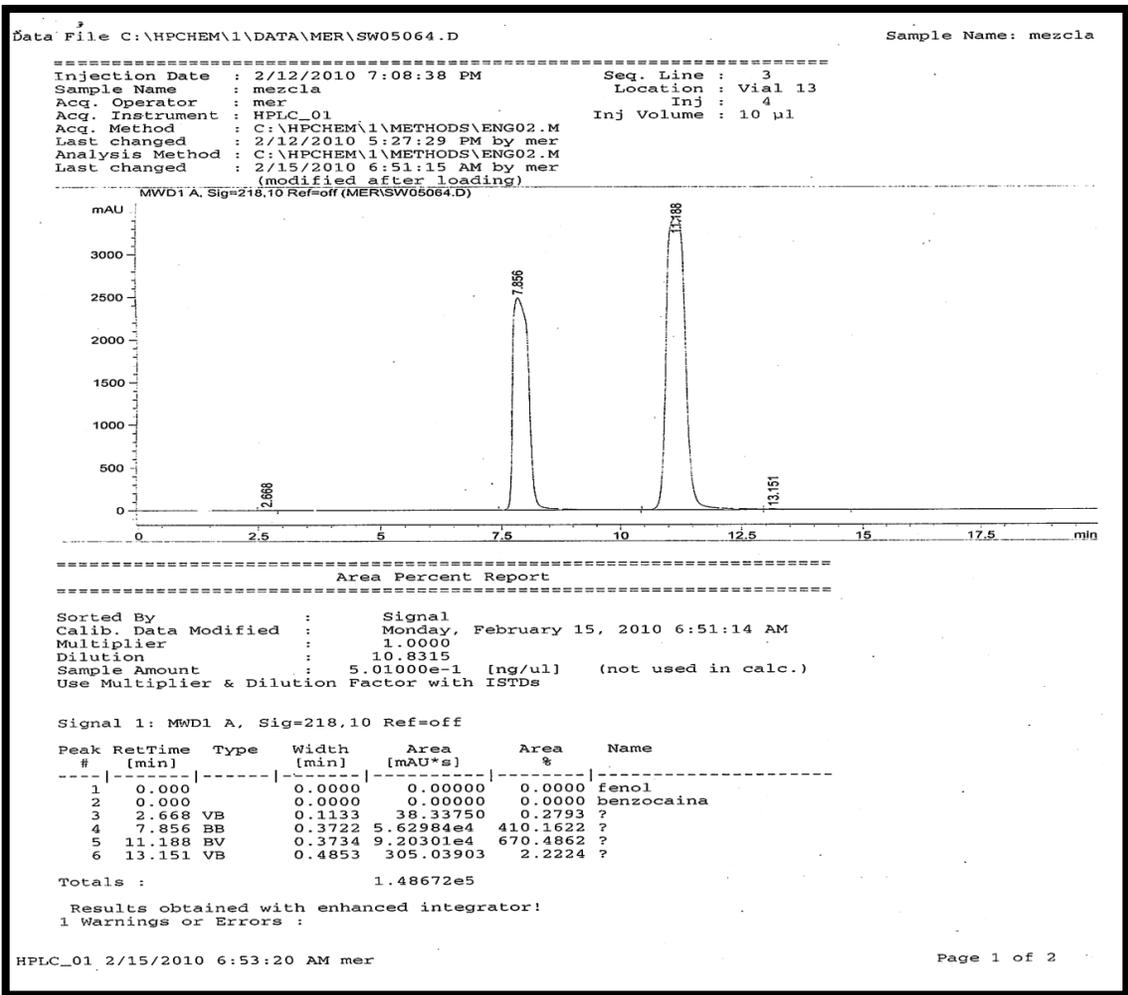


FIGURA (14) Cromatograma donde se observan los picos definidos y separados de Benzocaina y Fenol

8.1.1 METODO DESARROLLADO

- **REACTIVOS**

- Ácido fosfórico
- Metanol HPLC
- Agua HPLC

- **EQUIPO**

- Cromatógrafo de líquidos, Modelo 1200, Detector UV-Visible
- Balanza analítica Mettler Toledo, Modelo: AX26DR
- Sonicator marca Misonix, modelo 3510R-MHT

- **MATERIALES:**

- Columna: Metachem C18, 4 X 250 mm, 5 μ m
- Pipetas volumétricas de 1,2,5 y 10 mL
- Matraces volumétricos de 25,50 y 100 mL
- Probeta de 500 mL
- Reservorio de 1000 mL
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL

- **FASE MÓVIL:** Metanol: Ácido fosfórico al 0.1 % (60:40).

DILUYENTE: Agua-metanol 1/1

- **PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR DE FENOL:** Pesar 15 mg de estándar secundario de Fenol, colocarlo en un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y aforar con diluyente, mezclar. Colocar una alícuota de 5 mL en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con diluyente (Concentración = 7.5 μ g / mL).

- **PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR DE BENZOCAÍNA:** Pesar 20 mg de estándar secundario del componente Benzocaína, colocarlo en un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 2 mL de metanol diluir y aforar con diluyente, mezclar. Colocar una alícuota de 10 mL en un matraz volumétrico de 25 mL, y aforar con diluyente. (Concentración = 80 µg / mL).
- **PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:** Colocar una alícuota de 2 mL, equivalente a 0.36 mg de Fenol y 4 mg de Benzocaína en un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 25 mL de diluyente, sonicar 10 minutos, aforar con diluyente y mezclar. (Concentración = 7.5 µg / mL del componente Fenol y 80 µg de Benzocaína). Preparar por duplicado.
- **CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:**
 - Detector: UV a 218 nm
 - Temperatura: Ambiente
 - Flujo: 0.6 mL / minuto
 - Volumen de inyección: 10 µL
 - Tiempo de Retención aproximado (TR): 7.6 minutos para Fenol y 8.6 minutos para Benzocaína
 - Tiempo de Corrida: 10.0 minutos
- **LAVADO DE COLUMNA:** Al final de las muestras programar un vial con agua y seleccionar el siguiente método de lavado. Tabla 20

TIEMPO	AGUA	METANOL	FLUJO (mL)
20.0	70.0	30.0	1.0
10.0	20.0	80.0	1.0

Tabla (20) Lavado de columna

CALCULOS:

$$\text{mg de Fenol} / 100 \text{ mL} = \frac{\text{Área Muestra}}{\text{Área Estándar}} \times \frac{\text{Peso (mg) Estándar}}{100} \times \frac{5}{100} \times \frac{\text{Pureza Estándar}}{100} \times \frac{50}{0.36}$$

$$\text{mg de Benzocaína} / 100 \text{ mL} = \frac{\text{Área Muestra}}{\text{Área Estándar}} \times \frac{\text{Peso (mg) Estándar}}{100} \times \frac{10}{25} \times \frac{\text{Pureza Estándar}}{100} \times \frac{50}{4}$$

8.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

8.2. 1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

FENOL

ÁREA	TIEMPO DE RETENCION	FACTOR DE COLEO	No. PLATOS TEÓRICOS	
	418,80377	7,66374	0.30667	14704,38617
	417,48270	7,73844	0.31067	14619,98394
	422,92288	7,74373	0.31467	14280,71742
	428,62494	7,74134	0.32133	13702,22184
	426,27893	7,74754	0.32000	13641,57259
	426,11877	7,74030	0.31600	14151,36838
	424,74420	7,74549	0.31667	14054,91328
DESV	4,11529			
PROMEDIO	423,13946			
CV	0,972562016			

BENZOCAÍNA

AREA	TIEMPO DE RETENCION	FACTOR DE COLEO	No. PLATOS TEÓRICOS	
	3755,96460	8,57387	0,34500	14582,68667
	3774,43555	8,59926	0,34500	14532,38730
	3767,61816	8,59857	0,34444	14621,02789
	3761,52759	8,58770	0,34500	14629,75065
	3762,47754	8,58375	0,34333	14754,50336
	3766,68652	8,60093	0,34500	14538,02869
	3774,55493	8,63191	0,34500	14642,96723
DESV	6,83528			
PROMEDIO	3766,18070			
C.V	0,181490907			
CRITERIO DE ACEPTACION				
Coeficiente de variación (CV) $\leq 2 \%$				
Factor de Coleo (T) $\leq 2 \%$				
Número de Platos Teóricos (N) > 2000				

Tabla (21) Tablas de resultados de adecuabilidad del sistema

8.2.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

	FENOL	BENZOCAÍNA
MUESTRA	AREA	AREA
1	428,22974	3828,32861
2	426,96814	3802,20508
3	422,8063	3811,67334
4	422,02145	3821,03369
5	429,8804	3809,39648
6	423,664	3798,20605
PROMEDIO	425,3701567	3815,126057
DESV	3,029046176	9,182993035
<u>C.V</u>	<u>0.71</u>	<u>0.24</u>
CRITERIO DE ACEPTACION		
CV≤1.5 %		

Tabla (22) Tabla de resultados de precisión del sistema

8.2.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis por triplicado para cada dilución. Incluyendo la concentración seleccionada como el 100 %.

FENOL

CRITERIO DE ACEPTACION
COEF DE DETERMINACION $r^2 \geq 0.98$
INTERVALO DE CONFIANZA $IC(\beta_1)$
NO DEBE INCLUIR EL CERO

NIVEL	AREA
60%	242,22890
	231,93877
	256,51413
80%	333,20999
	332,67126
	333,30768
100%	421,62164
	411,77115
	414,86661
120%	446,28403
	505,02771
	471,08636
140%	583,80914
	584,81165
	582,22015

FENOL	
PENDIENTE	$b_1=4.10588$
ORDENADA AL ORIGEN	$b_0=-0.49663$
COEFICIENTE DE DETERMINACION	$r^2=0.982808$
INTERVALO DE CONFIANZA $IC(\beta_1)$	
LIMITE SUPERIOR	$=4.43126$
LIMITE INFERIOR	$=3.7805$

Tabla (23) Tabla de resultados de linealidad del sistema de Fenol

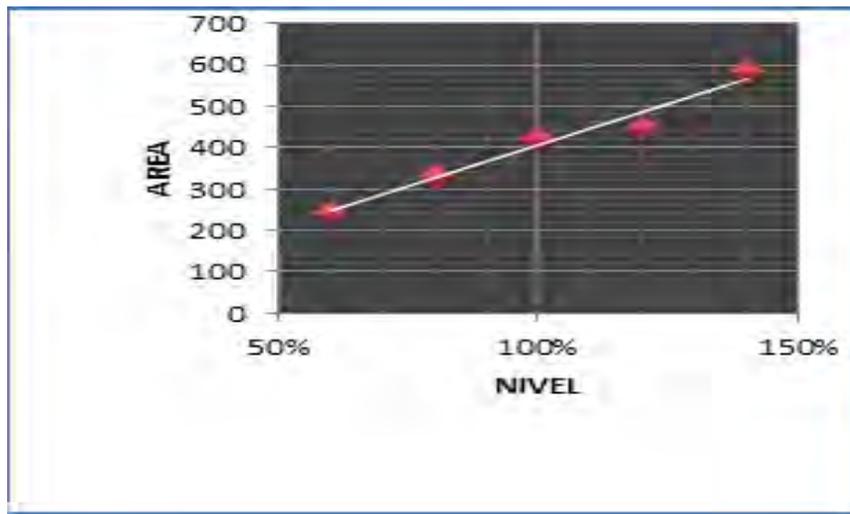


FIGURA (15) Curva nivel de concentración vs respuesta (área)

BENZOCAÍNA

NIVEL	ARE
60%	2306,56421
	2907,08667
	2580,45874
80%	3065,55518
	3087,26562
	3075,48193
100%	3820,21753
	3826,57666
	3819,88062
120%	4597,71289
	4614,79492
	4602,85449
140%	5379,83203
	5381,61572
	5364,55273

PENDIENTE	$b_1=35.41$
ORDENADA AL ORIGEN	$b_0=353.55$
COEFICIENTE DE DETERMINACION	$r^2=0.98115747$
INTERVALO DE CONFIANZA IC(β_1)	
LIMITE SUPERIOR	=38.359
LIMITE INFERIOR	=32.4771

Tabla (24) Tabla de resultados de linealidad del sistema de Fenol

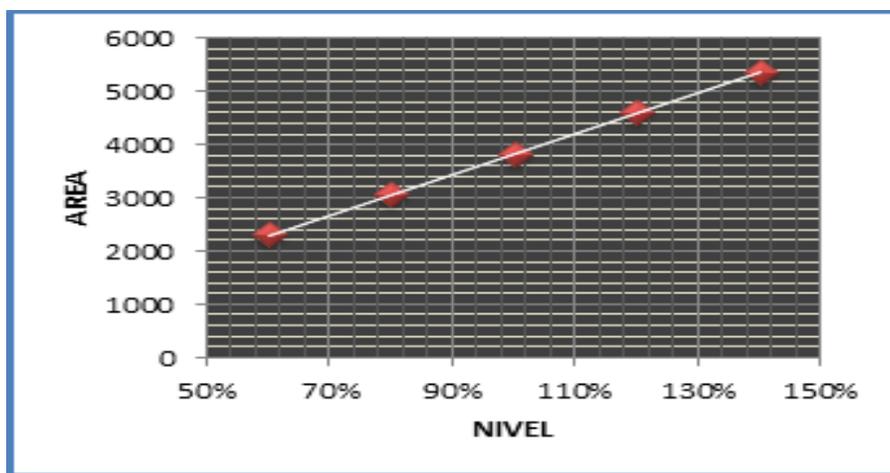


FIGURA (16) Curva nivel de concentración vs respuesta (área)

8.2.4 ESPECIFICIDAD

8.2. 4.1 PARA METODO DE CONTENIDO

Se analizaron de manera independiente 3 placebos del producto, se identificó la respuesta del activo, de los excipientes y de otras sustancias presentes.

El método desarrollado cuantifica la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

8.2.4.2 PARA METODO INDICADOR DE ESTABILIDAD

FENOL

MUESTRA	CONDICION	AREA	CONC. INICIAL	CONC. FINAL
PLACEBO	Luz	0,000	100%	N/A
	Media ácido	0,000	100%	N/A
	Media básico	0,000	100%	N/A
	Medio oxidativo	0,000	100%	N/A
	Temperatura	0,000	100%	N/A
ESTANDAR	Luz	447,71110	100%	100,04
	Media ácido	432,28235	100%	96,59
	Media básico	449,88040	100%	100,53
	Medio oxidativo	445,98142	100%	99,66
	Temperatura	426,67319	100%	95,34
PRODUCTO	Luz	418,00735	100%	104,43
	Media ácido	411,93655	100%	102,92
	Media básico	422,88019	100%	105,65
	Medio oxidativo	424,45221	100%	106,04
	Temperatura	416,95404	100%	104,17

Tabla (25) Tabla de especificidad para método indicador de estabilidad para el Fenol

BENZOCAÍNA

MUESTRA	CONDICIÓN	ÁREA	CONC. INICIAL	CONC. FINAL
PLACEBO	Luz	0,000	100%	N/A
	Media ácido	0,000	100%	N/A
	Media básico	0,000	100%	N/A
	Medio oxidativo	0,000	100%	N/A
	Temperatura	0,000	100%	N/A
ESTANDAR	Luz	4042,480	100%	102,0047
	Media ácido	3873,32495	100%	97,7364
	Media básico	0,000	100%	N/A
	Medio oxidativo	398,15726	100%	10,4487
	Temperatura	3194,94727	100%	80,6187
PRODUCTO	Luz	4032,906	100%	105,8336
	Media ácido	3875,72070	100%	101,7087
	Media básico	398,157	100%	10,4487
	Medio oxidativo	3793,33374	100%	99,5466
	Temperatura	3836,23389	100%	100,6725

Tabla (26) Tabla de especificidad para método indicador de estabilidad para la Benzocaina

8.2.5 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Se prepararon 6 placebos al 100 %, cargados de manera independiente, utilizando el método propuesto. Se realizó el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

FENOL

MUESTRA	ÁREA	ÁREA	MG	MG	PROMEDI O %	
		Promedi o	Adicionado s	Recuperado s		
EXACTITUD	1	440,7375 2	440,2480 3	0,79500	100,98	0,80277
		439,7585 4				
	2	437,3013 3	436,4534 3	0,79500	100,11	0,79585
		435,6055 3				
	3	438,4039 9	438,3128 5	0,79500	100,53	0,79925
		438,2217 1				
	4	438,5976 3	438,9582 9	0,79500	100,68	0,80042
		439,3189 4				
	5	438,2474 7	437,0504 8	0,79500	100,24	0,79694
		435,8534 9				
	6	440,3579 4	439,4980 8	0,79500	100,81	0,80141
		438,6382 1				

MEDIA ARITMÉTICA = 100,558
DESVIACIÓN ESTÁNDAR = 0,33439
COEFICIENTE DE VARIACIÓN = 0,332533
LÍMITE SUPERIOR DE CONFIANZA = 100,909
LÍMITE INFERIOR DE CONFIANZA = 100,207

CRITERIO DE ACEPTACION
El CV no debe ser mayor al 2 %
El IC(μ) debe incluir el 100 % ó que el promedio aritmético del porciento de recobro se incluya en el intervalo (98 al 102 %)

Tabla (27) Resultados de la exactitud de Fenol

BENZOCAINA

	MUESTRA	ÁREA	ÁREA	MG	MG	PROMEDIO %
			Promedio	Adicionados	Recuperados	
EXACTITUD	1	3640,12085	3659,0531	2,02000	100,35	2,02698
		3677,98535				
	2	3639,24756	3631,4624	2,02000	99,59	2,01170
		3623,67725				
	3	3618,88672	3625,6615	2,02000	99,43	2,00848
		3632,43628				
	4	3636,38892	3627,8134	2,02000	99,49	2,00967
		3619,23779				
	5	3602,37671	3602,6368	2,02000	98,80	1,99573
		3602,89697				
	6	3617,86743	3626,6769	2,02000	99,46	2,00904
		3635,48633				

MEDIA ARITMÉTICA = 99,52	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR = 0,494934	
COEFICIENTE DE VARIACIÓN = 0,497321	
LÍMITE SUPERIOR DE CONFIANZA = 100,039	
LÍMITE INFERIOR DE CONFIANZA = 99,0006	

Tabla (28) Resultados de la exactitud de Fenol

8.2.6 LINEALIDAD DEL METODO

Se determinó a partir de placebos adicionados de Fenol y Benzocaína, a 80, 100 y 120 %, se realizaron por triplicado de manera independiente.

FENOL

NIVEL	MUESTRA	AREA	PROMEDIO	MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS
80	1	322,64404	323,08302	0,62800	0,63728
		323,52200			
	2	324,50369	323,27156	0,62800	0,63765
		322,03943			
	3	321,92621	321,46582	0,62800	0,63409
		321,00543			
100	1	404,63705	404,12007	0,78500	0,79712
		403,60309			
	2	401,91812	401,974625	0,78500	0,79289
		402,03113			
	3	402,33496	402,1409	0,78500	0,79322
		401,94684			
120	1	472,42728	471,97995	0,94200	0,93097
		471,53262			
	2	472,5874	473,54457	0,94200	0,93406
		474,50174			
	3	472,07565	471,90576	0,94200	0,93083
		471,73587			

Límite superior del intervalo de confianza = 0,977151
Límite inferior del intervalo de confianza = 0,905737
Ordenada al origen = 0,0485344
Límite superior del intervalo de confianza = 0,0769358
Límite inferior del intervalo de confianza = 0,020133
Desviación estándar de regresión = 0,00580728
Coeficiente de variación = 0,737369
Coeficiente de determinación (r^2) = 0,99820228
Media aritmética del porcentaje recuperado = 100,487
Desviación estándar del porcentaje recuperado = 1,19012
Desviación estándar relativa = 1,18435
Límite superior del intervalo de confianza = 101,402
Límite inferior del intervalo de confianza = 99,5719

Tabla (29) Resultados de linealidad del método para el Fenol

BENZOCAINA

NIVEL	MUESTRA	AREA	PROMEDIO	MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS
80	1	322,64404	323,08302	0,62800	0,63728
		3386,61426			
	2	3390,31372	3391,96655	1,89600	1,90538
		3393,61938			
	3	3373,52539	3373,16822	1,89600	1,89483
		3372,81104			
100	1	4191,49609	4193,04761	2,37000	2,35538
		4194,59912			
	2	4254,56934	4250,62061	2,37000	2,38772
		4246,67188			
	3	4195,80664	4197,17627	2,37000	2,35770
		4198,5459			
120	1	5029,62402	5023,82593	2,84400	2,82206
		5018,02783			
	2	5012,6001	5013,44019	2,84400	2,81622
		5014,28027			
	3	5044,22559	5041,35523	2,84400	2,83190
		5038,48486			

Límite superior del intervalo de confianza = 0,996349
Límite inferior del intervalo de confianza = 0,950613
Límite superior del intervalo de confianza = 0,111385
Límite inferior del intervalo de confianza = 0,00155479
Desviación estándar de regresión = 0,0112286
Coeficiente de variación = 0,47506
Coeficiente de determinación (r^2) = 0,99930962
Media aritmética del porcentaje recuperado = 99,795
Desviación estándar del porcentaje recuperado = 0,601093
Desviación estándar relativa = 0,602328
Límite superior del intervalo de confianza = 100,257
Límite inferior del intervalo de confianza = 99,333

Tabla (30) Resultados de linealidad del método para el Fenol

CRITERIOS DE ACEPTACION CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA
$r^2 \geq 0.98$
EL IC(β_1) debe incluir la unidad
EL IC(β_0) debe incluir el cero
EL CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor al 2%
PORCENTAJE DE RECOBRO
EL IC(μ) debe incluir el 100% ó que en el promedio aritmético del % de recobro incluya el intervalo (98 al 102 %)
EL CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor al 2%

Tabla (31) Criterios de aceptación de linealidad del método

FENOL

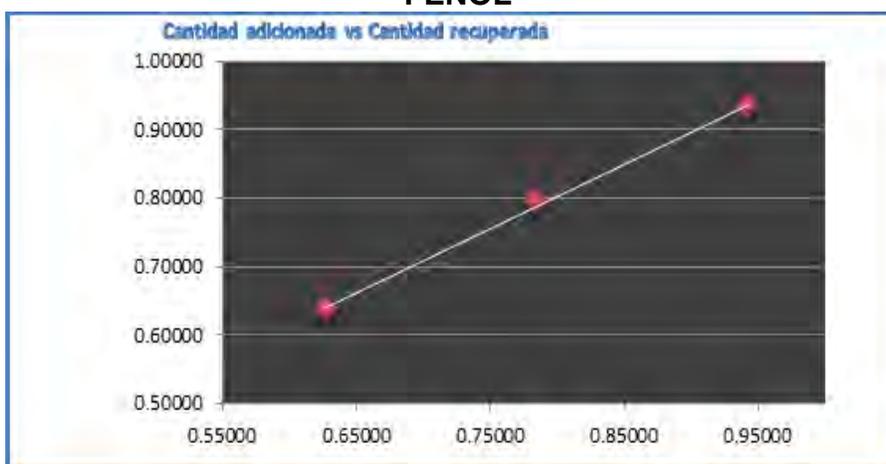


FIGURA (17) Curva de cantidad adicionada vs cantidad recuperada de Fenol

BENZOCAÍNA

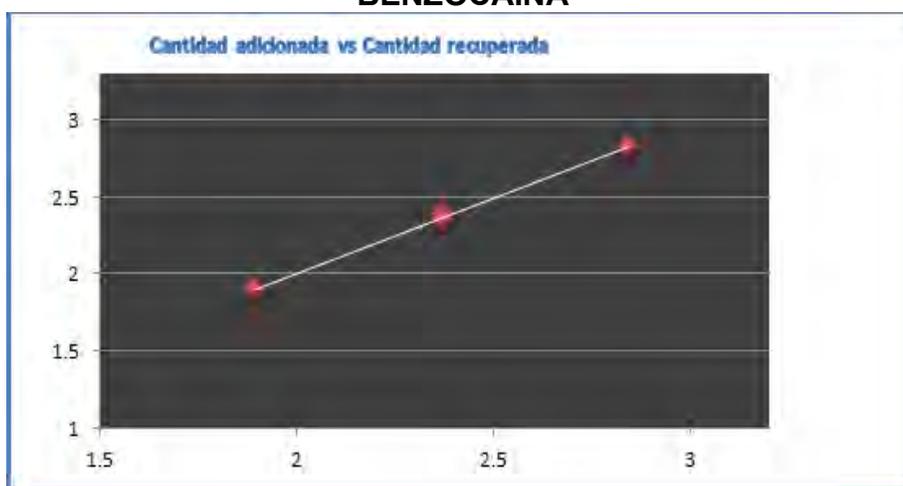


FIGURA (18) Curva de cantidad adicionada vs cantidad recuperada de Benzocaina

8.2.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se determinó a partir de una muestra homogénea del Enjuague Bucal como producto terminado, se realizó con dos analistas, en dos días por triplicado.

FENOL

	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	MUESTRA	RECOBRO	MUESTRA	RECOBRO
DIA 1	1	100,99	1	102,52
	2	101,72	2	102,49
	3	102,79	3	102,72
DIA2	1	104,68	1	105,25
	2	104,53	2	105,97
	3	105,05	3	106,23
	PROMEDIO	103,291467		104,195383
	DESVIACIÓN	1,70525746		1,80398031
	C.V	1,65091804		1,7313438
		<u>CV TOTAL:</u>	<u>1,69113092</u>	

Tabla (32) Resultados de la precisión del método para el Fenol

BENZOCAÍNA

	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	MUESTRA	RECOBRO	MUESTRA	RECOBRO
DIA 1	1	101,81	1	100,30
	2	101,49	2	99,46
	3	101,47	3	99,70
DIA2	1	100,11	1	99,60
	2	102,88	2	99,47
	3	103,00	3	99,30
	PROMEDIO	101,793333		99,6383333
	DESVIACIÓN	1,06464392		0,35147783
	C.V	1,04588766		0,35275362
		<u>CV TOTAL:</u>	<u>0,69932064</u>	

Tabla (33) Resultados de la precisión del método para el Fenol

CRITERIO DE ACEPTACION = C.V ≤ 2.0 %

8.2.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Se determinó la estabilidad de la muestra, analizando muestras almacenadas en refrigeración y temperatura ambiente durante 24 y 48 horas; utilizando una solución de referencia recién preparada a cada tiempo de análisis, las determinaciones se efectuaron por un mismo analista.

FENOL

MUESTRA	INICIAL %	24 hs T.A %	24 hs REF %	48 hs T.A. %	48 hs REF %
1	104,12	103,85	103,59	104,04	105,20
2	105,07	104,16	104,29	103,45	106,38
3	105,49	105,55	105,89	104,66	106,27
Condiciones de almacenaje		Media arit.	Diferencia	Idil	Interpretación
INICIAL		104,89	N/P	N/p	N/p
24 hs Tem. Ambiente		104,52	-0,37	0,37	MUESTRA ESTABLE
24 hs Refrigeración		104,59	-0,30	0,3	MUESTRA ESTABLE
48 hs Tem. Ambiente		104,05	-0,84	0,84	MUESTRA ESTABLE
48 hs Refrigeración		105,95	1,06	1,06	MUESTRA ESTABLE

Tabla (34) Resultados de la estabilidad analítica para el Fenol

BENZOCAÍNA

MUESTRA	INICIAL %	24 hs T. A %	24 hs REF %	48 hs T. A %	48 hs REF %
1	101,98	109,91	106,41	112,28	102,07
2	102,80	111,00	103,29	112,07	102,27
3	103,61	111,62	104,50	113,10	104,08
Condiciones de almacenaje		Media Arit	Di	Idil	Interpretación
INICIAL		102,80	N/P	N/p	N/P
24 hs Tem. Ambiente		110,84	8,05	8,05	MUESTRA INESTABLE
24 hs Refrigeración		104,73	1,93	1,93	MUESTRA ESTABLE
48 hs Tem. Ambiente		112,48	9,69	9,69	MUESTRA INESTABLE
48 hs Refrigeración		102,81	0,01	0,01	MUESTRA ESTABLE

Tabla (35) Resultados de la estabilidad analítica para el Fenol

CRITERIO DE ACEPTACION

De acuerdo al análisis estadístico la diferencia absoluta Idil debe ser menor de 2%

8.2.9 TABLAS DE RESULTADOS DE LA VALIDACION

FENOL

Parámetros	Criterios de aceptación		Resultado
Adecuabilidad del Sistema	Coeficiente de Variación (CV)	$\leq 2\%$	0.97 %
Precisión del Sistema	Coeficiente de Variación (CV)	$\leq 1.5\%$	0.71 %
Linealidad del Sistema	Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	0.982808
	Intervalo de Confianza $IC(\beta_1)$	No debe incluir el cero	3.7805 a 4.43126
Especificidad para Método de contenido	El método es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.		Cumple
Especificidad para Métodos indicadores de Estabilidad	Los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieren con la cuantificación de la sustancia de interés.		Cumple
Exactitud al 100%	Coeficiente de variación (CV)	$\leq 2.0\%$	0.332533 %
	El IC_{μ} debe incluir el 100 % ò que incluya el intervalo 98 AL 102 %	100%,(98 al 102%)	100.21 a 100.90 %
Linealidad del método	Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	0.99820228
	Intervalo de Confianza $IC(\beta_1)$	Debe incluir la unidad	0.977151 a 0.905737
	Intervalo de Confianza $IC(\beta_0)$	Debe incluir el cero	0.0769358 a 0.020133
	Coeficiente de variación (CV)	$\leq 2.0\%$	0.737369 %
	Intervalo de confianza (IC_{μ})	98 – 102%	99.57 a 101.40%
Precisión del Método	Coeficiente de variación (CV)	$\leq 2\%$	1.69 %
Estabilidad Analítica de la muestra	Diferencia absoluta $ d_i $	$ d_1 \leq 2\%$	0.37 %
		$ d_2 \leq 2\%$	0.30 %
		$ d_3 \leq 2\%$	0.84 %
		$ d_4 \leq 2\%$	1.06 %

Tabla (36) Resumen de resultados de la validación del método para el Fenol

BENZOCAINA

Parámetros	Criterios de aceptación		Resultado
Adecuabilidad del Sistema	Coeficiente de Variación (CV)	$\leq 2\%$	0.18 %
Precisión del Sistema	Coeficiente de Variación (CV)	$\leq 1.5\%$	0.24 %
<i>Linealidad del Sistema</i>	Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	0.981157
	Intervalo de Confianza $IC(\beta_1)$	No debe incluir el cero	32.4771 al 38.359
Especificidad para Método de contenido	El método es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.		Cumple
Especificidad para Métodos indicadores de Estabilidad	Los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieren con la cuantificación de la sustancia de interés.		Cumple
Exactitud al 100%	Coeficiente de variación (CV)	$\leq 2.0 \%$	0.4973 %
	El(IC_{μ}) debe incluir el 100 % ò que incluya el intervalo 98 AL 102 %	100%,(98 al 102%)	99.00 a 100.04 %
Linealidad del método	Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	0.99930962
	Intervalo de Confianza $IC(\beta_1)$	Debe incluir la unidad	0.99634 a 0.950613
	Intervalo de Confianza $IC(\beta_0)$	Debe incluir el cero	0.11138 a 0.001554
	Coeficiente de variación (CV)	$\leq 2.0 \%$	0.47506 %
	Intervalo de confianza (IC_{μ})	98 – 102%	99.33 a 100.25 %
Precisión del Método	Coeficiente de variación (CV)	$\leq 2\%$	0,69 %
Estabilidad Analítica de la muestra	Diferencia absoluta $ d_i $	$ d_1 \leq 2\%$	8.05 %
		$ d_2 \leq 2\%$	1.93 %
		$ d_3 \leq 2\%$	9.69 %
		$ d_4 \leq 2\%$	0.01 %

Tabla (37) Resumen de resultados de la validación del método para el Benzocaina

9. ANALISIS DE RESULTADOS

9.1 DESARROLLO DEL MÉTODO

En el pasado se intentó diseñar técnicas por Espectrofotometría UV-Visible para la cuantificación de los activos del enjuague bucal, debido a la complejidad de la formulación esto no fue posible. Tomando como base lo anterior, en este trabajo se decidió desarrollar una metodología por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

De acuerdo a la investigación bibliográfica sobre el comportamiento fisicoquímico de la Benzocaína y el Fenol se eligió el adecuado sistema de detección UV, tomando en consideración que ambas sustancias presentaban respuestas en el espectro UV y durante el desarrollo del método se pudo corroborar lo anterior.

Debido a que las sustancias son polares, se optó por la elección de una metodología en fase reversa eligiéndose una columna de características no polares C18, durante el desarrollo se encontró que la longitud de la columna era un factor determinante para la separación de los componentes por lo tanto se eligió la que separara mejor los componentes y esta fue la de 250 mm, debido a que en las columnas de 100 y 50 mm, no se logró la separación de los picos.

Se eligió la fase móvil de acuerdo a lo siguiente: características de solubilidad de las sustancias y características no polares de la columna C18. Por lo anterior se pensó en metanol como la fase móvil, al correr las muestras no se encontraron respuestas, por lo tanto se decidió adecuar la fase móvil adicionándole ácido fosfórico al 0.1 %, con el fin de aumentar la ionización y por ende la retención de las sustancias en el sistema de fase reversa, y con esto se logró encontrar respuesta de ambas sustancias.

A través de la experimentación se optimizaron las variables como: proporciones de la fase móvil, preparación y concentración de la muestra y estándares, flujo, volumen de inyección, tiempo de retención y tiempo de corrida, para obtener una adecuada resolución de los picos y finalmente obtener un método por HPLC para la cuantificación de dos de los principales activos del enjuague bucal.

9.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

- **Adecuabilidad del Sistema**

El CV no excede el 2.0 % en ambos componentes, por lo tanto se cumple con el criterio para adecuabilidad del sistema.

- **Precisión del sistema**

El CV no excede el 1.5 %, en ambos componentes, por lo tanto se cumple con el criterio para precisión del sistema.

- **Linealidad del sistema**

El sistema es lineal para ambos componentes dentro del rango de 60 a 140 %, ya que existe una relación altamente significativa entre % y área; donde $r^2 = 0.982808$ y 0.98115747 , respectivamente para el Fenol y Benzocaína; el $IC\beta_1$ va de 4.43126 a 3.7805, y de 38.359 a 47.00, respectivamente para Fenol y Benzocaína. Los rangos no incluyen el cero.

- **Especificidad**

- **Para métodos de contenido**

El método desarrollado cuantifica la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes

- **Para métodos indicadores de estabilidad**

De acuerdo a los resultados obtenidos del Fenol, el estándar debe cuidarse de ácidos, y altas temperaturas, en estas condiciones se presenta degradación, pero estas no interfieren con el pico de interés.

En cuanto a los resultados obtenidos de la Benzocaína, el estándar debe cuidarse de medios básicos, oxidación y altas temperaturas. El Producto terminado, debe cuidarse de medios básicos, en estas condiciones se presenta degradación, pero estas no interfieren con el pico de interés.

En relación a los resultados encontrados para los dos componentes en la evaluación de la especificidad podemos concluir que el método es indicativo de

estabilidad, ya que las degradaciones observadas no interfieren con los picos de interés.

- **Exactitud y Repetibilidad del método**

El CV, no es mayor al 2.0 % y el intervalo de confianza (IC_{μ}) está entre 98 y 102 %, por lo tanto se cumple con los criterios para Exactitud y Repetibilidad del método en ambos componentes.

- **Linealidad del método**

De acuerdo a los resultados obtenidos para los componentes Fenol y Benzocaína, el análisis de regresión para los resultados, la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación cumple con los parámetros establecidos para métodos cromatográficos, el recobro obtenido está dentro de especificaciones de 98 a 102 %, con un intervalo de confianza (IC_{μ}) de 99.57 a 101.40 para el Fenol y para la Benzocaína de 99.33 a 100.25. El intervalo de confianza $IC(\beta_1)$, no incluye la unidad y el intervalo de confianza $IC(\beta_0)$ no incluye al cero para ambos componentes. Tomando en cuenta que se trabajó con una formulación magistral y esta tiene como base extractos naturales, los cuales dificultan el análisis cuantitativo por la variedad de sus componentes, encontramos que el método no cumple con $IC(\beta_1)$ y $IC(\beta_0)$, sin embargo aun así existe relación altamente significativa entre cantidad adicionada y cantidad recuperada, por tanto se concluye que el método es lineal en el rango de 80 a 120 %, en ambos componentes y este cumple con la finalidad para la cual fue diseñado.

- **Precisión del método**

El C.V en ambos componentes fue menor al 2.0 %, cumple con el criterio para métodos cromatográficos.

- **Estabilidad Analítica de la muestra**

De acuerdo al análisis estadístico la diferencia absoluta $Idil$ debe ser menor de 2% por lo tanto

Para el Fenol

Se encontró que las muestras son estables a las condiciones a las que fueron sometidas, ya que tanto a las 24 y 48 horas en refrigeración y temperatura ambiente la diferencia absoluta fue menor al 2%, lo que significa que las muestras después de ser preparadas podrán ser analizadas hasta 48 horas después de su preparación, sin necesidad de refrigerarse, considerando alguna

situación imprevista que impidiera inyectar las muestras en el momento, o bien que pudieran ocurrir fallas en el equipo que provocaran que la corrida se interrumpiera.

Para la Benzocaína

De acuerdo a los resultados encontrados en las diferencias absolutas, se deduce que las muestras son inestables a temperatura ambiente, tanto a 24 como a 48 horas, por tanto, las muestras tendrán que ser analizadas después de su preparación, o bien si no se pueden trabajar en ese momento tendrán que guardarse en refrigeración hasta por 48 horas, sin embargo si la corrida es interrumpida y no se reprograma lo antes posible, las muestras tendrán que prepararse de nuevo.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo a la investigación bibliográfica sobre el comportamiento fisicoquímico de dos de los principales componentes de la formulación magistral del enjuague bucal y a través de la experimentación en laboratorio, se logró desarrollar un método de análisis indicativo de estabilidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, capaz de cuantificar Fenol y Benzocaína en la formulación, y que a partir de los resultados encontrados en la validación se determina que este método es confiable y puede ser utilizado para la cuantificación de los componentes en cuestión, ya que es lineal, exacto, preciso, reproducible y específico. Cumple satisfactoriamente con los parámetros de desempeño establecidos, por lo que podemos asegurar su consistencia durante su uso en el análisis del producto terminado o bien en un estudio de estabilidad.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Emili cuenca Sala, Carolina Manau Navarro, carolina Serra Majem, “Odontología Preventiva y Comunitaria, Principios, Métodos y Aplicaciones”, 2ª edición, Editorial Masson, S.A, Barcelona, España, 53-55, 70-72, 1995.
2. <http://www.slideshare.net/Dayshany/soluciones-7719840>. Consultada en Marzo 20 de 2010
3. Farmacopea de los Estados Unidos de América. 30ª edición, volumen I, Formulario Nacional, 25, USP Pharmacopeia, USA. 180, 681-682, 1250 2007.
4. Remington: the Science and Practical Pharmacy, 19ª edición, vol.II, editorial Medica Panamericana, Argentina, 646-649, 934-946, 2302-2303, 1995.
5. “Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”, Liquid oral preparations, 2a, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 2, 1674 – 1683, 2002.
6. NORMA Oficial Mexicana PROY-NOM-164SSA1-2005,, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
7. Validación de los métodos analíticos. En: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. México D.F., 7ª ed. 2004:1-73.
8. Castro M, Gascón S., Pujol M., Sans J.P., Vicente L.L. . Validación de métodos analíticos. En: Monografía de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Barcelona: Edición Hewlett Packard., 1999: 1-94.
9. www.vv.es/baeza/metodo.html. Consultada en Enero 20 de 2010
10. www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos. Consultada en Enero 20 de 2010
11. www.sailab.es/02e3cf98dc0daba07/.../index.html. Consultada en Enero 20 de 2010

12. www.oaa.org.ar/evaluadores/dc-le-05. Consultada en Enero 26 de 2010
13. <http://www.losmedicamentos.net/articulo/desarrollo-y-validacion-de-una-tecnica-analitica-por>. Consultada en Enero 26 de 2010
14. http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol35_3_01/Far3201.pdf, Consultada en Enero 28 de 2010
15. <http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones>. Consultada en Febrero 2010
16. http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_10.pdf. Consultada en Febrero 10 de 2010
17. <http://www.aulavirtualexactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L1RQL1RyYWJham9fcC00LS5wZGY%3D&cidReset=true&cidReq=QUIMBIO>. Consultada en Febrero 10 de 2010
18. <http://www.fing.edu.uy/iq/analisis/cursos/ainst/hplc.pdf>. Consultada en Marzo 20 de 2010
19. <file:///C:/Users/Invitado/Desktop/CURSO-MONOGRAFICO-DE-HPLC.htm>. Consultada en Marzo 20 de 2010
20. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 9ª edición, Vol. I, Secretaría de Salud, México, 335-339, 2008.
21. ICH Harmonized tripartite guideline, Validation of Analytical Procedures Text and Methodology, 4ª version, November 2005.
22. Validación de Métodos Analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. 1991
23. NOM-059-SSA1-2006, Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de medicamentos, publicada del 31 de julio de 1998.

24. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 9ª edición, Vol. II, Secretaría de Salud, México, 2427-2431, 704-705, 2008.
25. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de fármacos y medicamentos (modificada a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996).
26. GUIA DE VALIDACION DE METODOS ANALÍTICOS, Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A. C.
27. Moffat A.C. Clarke's isolation and identification of drugs, in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. London: 2a ed. The Pharmaceutical Press.,1986:638-715
28. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8ª edición, Vol. I, Secretaría de Salud, México, 576-578, 583-588, 2007.
29. NORMA Oficial Mexicana NOM-176-SSA1-1998, Requisitos sanitarios que deben cumplir los fabricantes, distribuidores y proveedores de fármacos utilizados en la elaboración de medicamentos de uso humanos.
30. Loyd, V., "The Art, Science and technology of Pharmaceutical Compounding", 2a, American Pharmaceutical Association, Washington, USA, 231-233, 2002.
31. http://www.inquifor.com/wp-content/uploads/BLOQUE_II_3_2011_2012.pdf
Consultada en Noviembre 10 del 2012
32. http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5075307
Consultada en Noviembre 10 del 2012
33. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/073ssa105.html>
Consultada en Noviembre 10 del 2012
34. <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/suple2/suple2.html>
Consultada en Noviembre 15 del 2012
35. http://www.esteripharma.com/Pdf_View.php?Concepto=7&Archivo=antiseptico.pdf
Consultada en Noviembre 20 del 2012

36. <http://es.scribd.com/doc/102022330/49/Preparacion-de-la-fase-movil>
Consultada en Noviembre 25 del 2012
37. <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/filtro.htm>
Consultada en Noviembre 25 del 2012
38. <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm>
Consultada en Diciembre 01 del 2012
39. <http://www.pucpr.edu/titulov/Q420/Capitulo%2028%20B.pdf>
Consultada en Diciembre 01 del 2012
40. <http://www.slideshare.net/jestval/tablas-de-polaridad-de-solventes-organicos>
Consultada en Diciembre 01 del 2012
41. <http://www.odontologos.mx/pacientes/reportajes/gustavoencias/cariesdental.pdf>
Consultada en Diciembre 01 del 2012

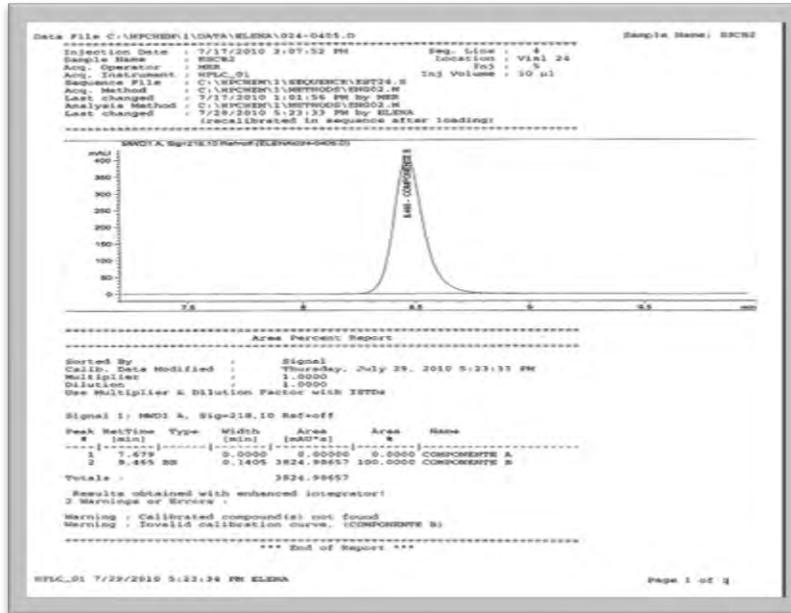
12. ANEXOS

12.1 SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

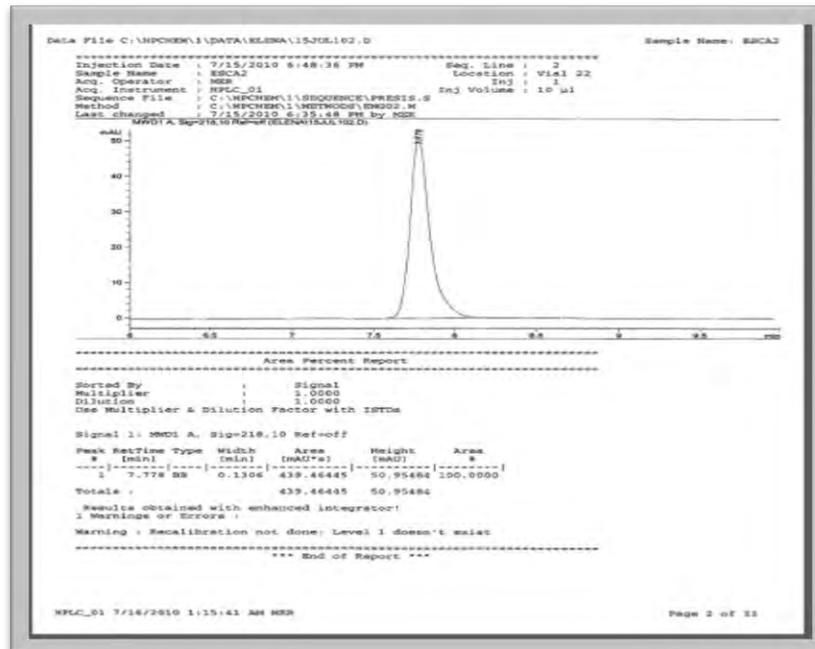
CV	Coeficiente de variación o desviación estándar
Idil	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial
IC(β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente poblacional
IC(β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen de la población
IC(μ_1)	Intervalo de confianza para la media poblacional
Mg	miligramos
N	Número de platos teóricos
T	Factor de coleo
R	Resolución
r^2	Coeficiente de determinación

12.2 CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA VALIDACIÓN

1. CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR BENZOCAÍNA (Componente B)



2. CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR DE FENOL (Componente A)



3. CROMATOGRAMA DE BENZOCAINA Y FENOL EN LA MUESTRA ANALIZADA

