

2ej
42



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
DE ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR)
PARA CUANTIFICAR TRES CONSERVADORES
EN UNA SUSPENSION INYECTABLE DE
ACETATO DE PREDNISOLONA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**P R E S E N T A:
LETICIA GARCIA MONTES DE OCA**

1 9 8 6.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

1. INTRODUCCION

2. GENERALIDADES

- 2.1. Productos estériles.
- 2.2. Conservadores.
- 2.3. Monografías
- 2.4. Cromatografía.
 - 2.4.1. El proceso cromatográfico.
 - 2.4.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)
 - 2.4.3. Instrumentación.
- 2.5. Desarrollo de un método analítico por CLAR.
- 2.6. Validación de métodos analíticos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

- 3.1. Desarrollo del sistema.
- 3.2. Reactivos y soluciones estándar.
- 3.3. Validación del método analítico.

4. CONCLUSIONES

5. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION.

Es sumamente importante el papel que juegan los conservadores en la conservación microbiológica de un producto farmacéutico, tanto para la estabilidad y efectividad del mismo como para la seguridad del paciente; por lo cual es necesario comprobar que la concentración del conservador presente en la formulación, es la adecuada para cumplir tales objetivos. Se requiere por lo tanto desarrollar y validar técnicas de análisis para cuantificar los conservadores en una formulación durante el desarrollo de un producto nuevo y en su posterior control de calidad para su adecuada comercialización.

En el presente trabajo se expone el desarrollo y validación de un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar los conservadores metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico en una suspensión de acetato de prednisolona.

Se encuentran reportados en la literatura, varios métodos de análisis para cuantificar parabenos y alcohol bencílico en diferentes productos farmacéuticos, entre los cuales se encuentran métodos volumétricos, espectroscópicos y cromatográficos. (1,2,4,6-7,10-15, 19, 20, 22, 25-27)

Se eligió usar CLAR porque ofrece las ventajas siguientes: selectividad óptima, análisis rápidos y automatizados, mayor reproducibilidad (alta precisión) y una adecuada exactitud.

Las sustancias a separar son: alcohol bencílico, benzaldehído (con

taminante común del alcohol bencílico), metilparabeno, propilparabeno y prednisolona alcohol (contaminante del acetato de prednisolona) además del estándar interno, que en este caso es el etilparabeno.

Se pensó en un método de análisis con estándar interno porque proporciona mayor reproducibilidad ya que puede haber variaciones en el volúmen de inyección sin que ésto origine falta de precisión.

Una vez desarrollado el sistema se procedió a validarlo estadísticamente, lo que implicó determinar su tolerancia, linealidad y precisión, posteriormente se estudió la especificidad a temperatura ambiente, exactitud, linealidad y precisión del método, así como la estabilidad de la muestra tratada para ser inyectada en el cromatógrafo.

2. GENERALIDADES.

2.1 Productos estériles.

Son formas farmacéuticas dosificadas libres de contaminación microbiana y de compuestos tóxicos, que poseen una pureza excepcionalmente alta; por lo cual se deben seleccionar cuidadosamente todos los componentes y procesos involucrados en su fabricación para eliminar las contaminaciones de origen físico, químico y microbiológico.

El desarrollo de los productos estériles no fue posible sino hasta después de los trabajos sobre microbiología de Koch y Pasteur, y de que Chamberland desarrollara las técnicas de esterilización por aire caliente y vapor; más o menos al mismo tiempo Nordtmeyer desarrollaba un filtro hecho con Kieselguhr (filtro Berkefeld) y Limousin diseñaba una ampollita de vidrio.

En los 1800's, Wood inventó la jeringa. En 1870, la Real Sociedad Médica y Quirúrgica de Londres, redactó un reporte en que estableció las bases de la terapia hipodérmica y señaló que los fármacos inyectados bajo la piel tendría los mismo efectos terapéuticos que los que se administraban oralmente, no obstante aquéllos podrían diferir en intensidad. El reporte sugiere que las soluciones para ser inyectadas debe ser claras y neutras.

En 1874, la Farmacopea Británica reconoció oficialmente la primera solución inyectable, una solución de morfina.

En 1889, se preparó una inyección de ergotamina con 1% de fenol co-

mo agente conservador. En 1905, Duffour hizo una tesis doctoral sobre la esterilización de soluciones hipodérmicas. En 1911, Martindale y Wynn enfatizaron la importancia de los procesos de esterilización y las técnicas asépticas para la manipulación de los componentes en la fabricación de inyectables.

A mediados del siglo XX, el Dr. Seibert proporcionó pruebas de que la fiebre después de una inyección, era una reacción causada por productos del crecimiento bacteriano que podían ser eliminados del agua por destilación y del vidrio por calentamiento a temperaturas elevadas.

Todo ésto permitió el desarrollo de los productos estériles tal como los encontramos en nuestros días (9).

Los productos estériles presentan las siguientes características generales (16, 21):

ESTERILIDAD: Consiste en la ausencia total de microorganismos vivos. Es el factor fundamental en la preparación de productos de esta naturaleza, ya que la introducción de microorganismos a un tejido u organismo puede causar una enfermedad o incluso la muerte.

ISOTONICIDAD: Significa que una solución tiene la misma presión osmótica que la célula o fluidos biológicos con que estará en contacto.

La isotonicidad se logra añadiendo sales a las soluciones inyectables u oftálmicas en las cuales es un requisito. Existen fórmulas y tablas en la literatura para calcular soluciones isotónicas, así como métodos de control.

pH: Es un factor muy importante tanto para el producto en cuanto a su estabilidad y efectividad, como para el paciente al que se le administra el medicamento para evitarle molestias y daños innecesarios. Para lograr la estabilización del pH se utilizan sistemas amortiguadores que deben ser de baja capacidad para que no ocasionen cambios significativos en la zona donde se aplique el producto.

CONSERVACION: Los productos farmacéuticos estériles deben ser capaces de evitar el crecimiento de microorganismos, por lo que es necesario la adición de agentes conservadores así como la elección de un envase adecuado, que no interaccione con el producto y lo aisle perfectamente del medio. Esto es especialmente importante para los productos contenidos en envases multidosis.

LIBRE DE PIROGENOS: Los pirógenos son productos metabólicos de las bacterias que producen un incremento en la temperatura corporal cuando se introducen a un organismo, por lo que su control es importante en el caso de los inyectables.

Los productos estériles son en términos generales:

- A. Inyectables
- B. Oftálmicos
- C. Soluciones irrigantes

Los inyectables son preparaciones que se administran a un paciente por medio de la introducción mecánica debajo o a través de una o más capas de la piel o de la membrana mucosa.

Las inyecciones se pueden clasificar en nueve categorías generales de acuerdo a la ruta de administración:

- | | |
|------------------|--------------------|
| a. Intravenosa | f. Intratecal |
| b. Subcutánea | g. Intraarterial |
| c. Intradérmica | h. Intraraquídea |
| d. Intramuscular | i. Intraperitoneal |
| e. Intraespinal | |

Suspensiones Inyectables

Una suspensión farmacéutica puede ser definida como una dispersión de materiales insolubles finamente divididos que se encuentran suspendidos en un medio líquido.

Las partículas en dispersión deben ser de una dimensión tal que no puedan sedimentar rápidamente en el vehículo, o deben de ser capaces de redispersarse con el mínimo esfuerzo por parte del paciente. Así mismo el producto debe ser fácil de verterse y ser resistente al ataque microbiano.

Las suspensiones presentan las siguientes ventajas:

*Pueden formar un depósito del fármaco y una acción prolongada en el caso de las inyecciones intramusculares o una acción rápida si el fármaco se absorbe rápidamente.

*Es posible administrar principios activos insolubles, o bien principios activos que sólo pueden disolverse en disolventes fisiológicamente inaceptables.

*La estabilidad física y química de un fármaco puede ser incrementada al reducir el contacto interfacial entre el fármaco y el medio,

cuando está en forma de suspensión.

Los tres problemas principales de las suspensiones que deben resolverse con una formulación adecuada son:

- a) Adecuada dispersión de las partículas en el vehículo.
- b) La sedimentación de las partículas dispersas.
- c) La gran aglutinación de estas partículas en sedimento, de tal forma que se resista a la redispersión.

El conocimiento de los factores que influyen en estos procesos permite minimizar estos problemas. Estos factores son en términos generales (17):

*Propiedades de interfase (energía libre de la superficie y carga eléctrica de la misma).

*Viscosidad.

*Tamaño y forma de la partícula en suspensión.

*Densidad del medio.

*Tensión superficial y fuerza iónica del medio.

Además del o de los principios activos, la formulación de las suspensiones inyectables pueden incluir:

-Modificadores de la viscosidad.

-Agentes tensoactivos.

-Agentes flocculantes o dispersantes.

-Reguladores del pH.

-Modificadores de la densidad.

-Antioxidantes.

-Agentes quelantes.

-Conservadores.

La incorporación de los materiales al vehículo, se realiza en un or
den de acuerdo a las propiedades de cada uno de los ingredientes.

2.2. Conservadores.

Un conservador es aquella substancia que se adiciona a algunas preparaciones para prevenir el crecimiento microbiano y la descomposición del producto, lo cual es muy importante tanto para la estabilidad del mismo como para la seguridad del paciente al que se le administra.

El conservador ideal debe tener las siguientes características (16):

- *Ser efectivo contra un amplio espectro de microorganismos.
- *Ser estable física, química y microbiológicamente por el tiempo de vida de anaquel del producto.
- *No debe ser tóxico.
- *Debe solubilizarse adecuadamente, ser compatible con los demás componentes de la formulación y aceptable con respecto al sabor y olor a las concentraciones usadas.
- *No debe de sensibilizar.

Los agentes conservadores se pueden clasificar en cuatro grandes -- grupos (16):

- a) Acídicos
- b) Neutros
- c) Mercuriales
- d) Sales cuaternarias de amonio

La tabla siguiente enlista algunos conservadores usuales y las concentraciones usadas con mayor frecuencia.

TABLA NO. 1

CLASE		CONCENTRACION USUAL (%)
Acídicos:	Fenol	0.2 - 0.5
	Clorocresol	0.05 - 0.1
	Parabenos	0.005 - 0.01
	Acido benzoico y sales	0.001 - 0.2
	Acido bórico y sales	0.5 - 0.2
	Acido sórbico y sales	0.05 - 0.2
Neutros:	Clorobutanol	0.5
	Alcohol bencílico	1.0
	Alcohol B-feniletílico	0.2 - 1.0
Mercuriales:	Timerosal	0.001 - 0.1
	Acetato fenilmercúrico	0.001 - 0.005
	Nitromersol	0.001 - 0.1
Sales cuaternarias de amonio:		
	Cloruro de benzalconio	0.004 - 0.02
	Cloruro de cetilpiridinio	0.01 - 0.02

2,3 MONOGRAFIAS

ALCOHOL BENCILICO

Fenilcarbinol, fenilmetanol. $C_6H_5OH = 108.1$. Líquido incoloro con un sabor ligeramente picante. P.e. = 203 - 208°C. $d = 1.043 - 1.046$ g/ml. (24).

Solubilidad: Es soluble 1/25 de agua. Miscible con alcohol, cloroformo, éter, en aceites fijos y volátiles.

pH: Una solución en agua es neutra al litmus.

Estabilidad: Las soluciones pueden ser esterilizadas en autoclave. Se oxida lentamente a benzaldehído y ácido benzoico a la exposición del aire. Incompatible con agentes oxidantes. Se requiere protegerlo de la luz. (3)

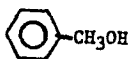
Efectos Tóxicos: La inyección intratecal de alcohol bencílico al 0.9% causó meningitis aséptica en perros.

Métodos de análisis:

- a) Método especificado en la USP XX: Cromatografía de gases.
- b) Espectroscopía de fluorescencia.
- c) Valoración yodométrica.
- d) CLAR

USO: Analgésico y conservador. La concentración usual es 1%.

Fórmula Química:



METILPARABENO

Metilparabeno, p- hidroxibenzoato de metilo, nipagín. $C_8H_8O_3$ -152.1.
Polvo cristalino, fino, blanco y amargo. Produce la sensación de --
que quema la boca y la lengua, seguido por entumecimiento. $pK_a=9.46$;
p.f. 125 - 128°C. (24)

Solubilidades: 1/100 de agua; 1/120 de agua hirviendo; 1/3.5 de e-
tanol; 1/3 de acetona; 1/140 de cloroformo; 1/10 de éter; 1/3 de pro-
pilénglicol; 1/140 de aceite vegetal; 1/160 de glicerol caliente; so-
luble en metanol y álcalis; poco soluble en benceno y tetracloruro -
de carbono.

Estabilidad: Se hidroliza catalíticamente en presencia de ácidos y
bases, además es incompatible con las sales de hierro. El pH de má-
xima estabilidad es 4, por lo cual se utiliza en un intervalo de pH
de 3 - 9.

El metilparabeno se hidroliza produciendo ácido p-hidroxibenzoico y
metanol (3):



La reacción es de primer orden con respecto a la concentración de és-
ter.

Otros datos: La velocidad de hidrólisis del metilparabeno se incrementa ligeramente al aumentar la fuerza iónica.

La actividad antimicrobiana se reduce de un 75 a un 100% en la presencia de silicato de magnesio y aluminio al 1%, talco, polisorbato 80 y trisilicato de magnesio (18).

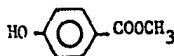
Algunos plásticos como el nylon 6 absorben al metilparabeno y al propilparabeno disminuyendo su actividad antimicrobiana contra *Aspergillus niger*, *Klebsiella aerógenes* y *Pseudomona aeruginosa* (18).

Métodos de Análisis:

- a) Método oficial (Farmacopea Nacional): Valoración residual con ácido sulfúrico, usando como indicador el azul de bromotimol S.I. Se compara con el color de una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.6 que contiene la misma cantidad de conservador.
- b) Método especificado en la USP XX: Cromatografía de gases.
- c) Espectroscopía U.V.
- d) Cromatografía en capa fina.
- e) Resonancia Magnética nuclear.
- f) Método bromométrico, previa hidrólisis
- g) CLAR.

Usos: Se utiliza como conservador en concentraciones de 0.05-0.25%. Se usa en combinación con otros parabenos como el butil- y etilparabeno en medicamentos para el tratamiento de faringitis.

Fórmula Química:



PROPILPARABENO

Propilparabeno, p-hidroxibenzoato de propilo, Nipasol. $C_{10}H_{12}O_3=180$.
Polvo cristalino, blanco, inodoro, sin sabor o con un sabor muy ligero. p.f.: 95 - 98°C (24).

Solubilidades: Soluble 1/2500 de agua fría; 1/400 de agua caliente; -
1/3.5 de etanol; 1/3 de acetona; 1/4 de cloroformo; 1/3 de éter; ----
1/140 de glicerol; 1/6 de propilénglicol; 1/140 de aceites fijos; soluble en metanol; fácilmente soluble en soluciones alcalinas.

Estabilidad: Incompatible con álcalis y sales de hierro. Sufre catálisis ácida y básica. El pH de máxima estabilidad está entre 4 y 5.

El propilparabeno se hidroliza produciendo ácido p-hidroxibenzoico y propanol:



La reacción es de primer orden con respecto a la concentración del éster (3).

Otros datos: Se ha encontrado que el propilparabeno y el metilparabeno no se unen a la macromolécula cetomacrogol mediante enlaces no covalentes. Se cree que la especie unida es inefectiva como agente conservador (18).

Métodos de Análisis:

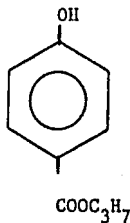
a) Método oficial (Farmacopea Nacional): Valoración residual con á

-cido sulfúrico.

- b) Método especificado en la USP XX: Cromatografía de gases.
- c) Espectroscopía U.V.
- d) Cromatografía en capa fina.
- e) Resonancia magnética nuclear.
- f) Método bromométrico, previa hidrólisis.
- g) CLAR.

USOS: Se utiliza como conservador en concentraciones de 0.05 - 0.25% sólo o en compañía de otros parabenos.

Fórmula Química:



2.4 CROMATOGRAFIA

La solución de numerosos problemas que se presentan en los campos de la química pura y aplicada (estudios de metabolitos y mecanismos de reacción, preparación de compuestos orgánicos nuevos, control de calidad, etc.), está supeditada al aislamiento e identificación de ciertas especies orgánicas o inorgánicas existentes en una mezcla. El proceso normal de análisis consiste en separar los productos deseados para proceder a continuación a su identificación por medio de reacciones químicas o midiendo ciertas propiedades físicas.

Los últimos años han conocido el auge espectacular de los métodos físicos de identificación tales como la espectrofotometría ultravioleta, visible e infraroja; espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear; polarimetría; polarografía, etc. El mayor inconveniente de estas técnicas estriba en que la sustancia a identificar debe poseer cierto grado de pureza para que el método resulte efectivo.

Los procedimientos clásicos de separación (destilación, cristalización, etc.) pueden conducirnos, tras laboriosas operaciones, a productos con un alto grado de pureza, pero en general, nos dan poca información acerca de la naturaleza de tales sustancias. Estos procedimientos han sido desplazados en gran parte por los distintos tipos de cromatografía, más simples y rápidos en su realización práctica y en general, de un poder separador más alto. Incluso la idea que nos pueden dar acerca de la naturaleza de cada componente de la mezcla puede ser bastante orientadora en algunos tipos de cromatografía.

2.4.1 El proceso cromatográfico:

El principio común a todas las técnicas cromatográficas es el siguiente: un fluido (fase móvil) circula a través de una fase estacionaria (sólida o líquida).

Cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema, se produce una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de magnitud diferente para cada componente de la mezcla, por lo cual cada uno de ellos se desplazará con velocidad diferente a lo largo del sistema.

Las sustancias deben ser solubles en la fase móvil y según sea el tipo de interacción con la fase estacionaria, podemos clasificar el proceso de la manera siguiente (8, 15, 23, 28 y 29):

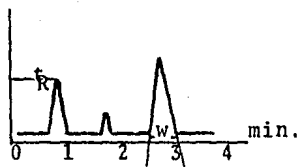
1. ADSORCION
2. INTERCAMBIO IONICO
3. FILTRACION SOBRE GELES POROSOS
4. REPARTO

Existen 3 formas de desarrollar el proceso:

- a) Elución
- b) Análisis frontal
- c) Desplazamiento

El método que se usa con mayor frecuencia en estos tipos de cromatografía, gases o líquido, es la elución. En este caso se introduce una porción pequeña de la muestra a la fase móvil, gas o líquido, la muestra viaja a través de la columna, los componentes dentro de la columna comienzan a separarse uno de otro en bandas diferentes. Finalmente las bandas eluyen al final de la columna y son medidos por un detector.

En la figura siguiente se muestra un cromatograma de elución:



t_R = tiempo de retención
 w = amplitud de la banda

Hay dos constantes que describen la distribución de un componente de la muestra entre las fases estacionaria y móvil (23, 29), el coeficiente de partición o distribución (K), que relaciona la concentración de la muestra (X) en las dos fases:

$$K = \frac{\text{Concentración en la fase estacionaria}}{\text{Concentración en la fase móvil}} = \frac{(X)_s}{(X)_m}$$

la relación de partición o distribución (k'), conocida como factor de capacidad es un término más conveniente porque representa la relación de cantidades o moles de la muestra (M) en las dos fases. Se define como sigue:

$k' = \text{Cantidad en la fase estacionaria} / \text{Cantidad en la fase móvil} = M_s / M_m$
 k' se puede relacionar fácilmente con K , puesto que la cantidad es igual a la concentración por el volumen. k' puede ser escrito:

$$k' = (X)_s V_s / (X)_m V_m \quad \text{o} \quad k' = K V_s / V_m$$

La relación de partición es característica para una columna dada, ya que se incluyen los volúmenes de la fase.

Las propiedades del sistema de separación se definen por la selectividad (α), siendo la retención relativa y la relación de los factores de capacidad k' de dos sustancias:

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = t_{R2} / t_{R1} \quad \alpha = k'_2 / k'_1 = t_{R2} / t_{R1} \quad t_R = t_R - t_0$$

La calidad de una separación viene caracterizada por la resolución R_s entre dos sustancias de una mezcla, que se puede calcular a partir de los tiempos de retención t_{R1}' y la anchura de los picos W medida en la base entre las tangentes del punto de inflexión:

$$R_s = 2 (t_{R2}' - t_{R1}') / W_2 + W_1$$

El número de platos teóricos N es una medida de la eficiencia de la columna, - indica la importancia relativa de los fenómenos que provocan la dispersión de la banda respecto a la retención del compuesto. A continuación se enlistan algunos factores que afectan a N :

1. El tamaño de partícula
2. La distribución de los tamaños de partícula
3. La forma de dichas partículas

El número de platos teóricos se puede calcular mediante la ecuación siguiente:

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

La altura del plato teórico (H) se calcula como sigue a partir del cromatograma:

$$H = L/N = L (W/t_R)^2 / 16 \quad \text{donde } L = \text{longitud de la columna.}$$

El número de platos teóricos, es inversamente proporcional a la altura del plato:

$$N = L / H$$

y está relacionado con el número de platos efectivos (N_{eff}) a través de los factores de capacidad (k') :

$$N_{\text{eff}} = \left[\frac{k'}{k' + 1} \right]^2 \cdot N$$

y también por medio del tiempo de retención reducido mediante la siguiente expresión:

$$N_{\text{eff}} = 16 \left(t_R' / W \right)^2$$

A partir de las magnitudes α , k' y N se puede deducir una ecuación fundamental cuantitativa para la resolución R_s . Esta relación es de tipo general y vale para cualquier técnica cromatográfica. Sirve como fundamento para la elección de los sistemas de separación (28):

$$R_s = \frac{1}{4} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{k' + 1} \right] \cdot (N_2)^{\frac{1}{2}} \quad \text{donde } N_2 = \text{número de platos teóricos para el segundo componente.}$$

Esta ecuación expresa la resolución en términos de selectividad (1), capacidad o retención (2) y de la eficiencia de la columna (3).

El efecto de α en R_s está determinado por el término 1, el cual debe ser lo más grande posible. Si α aumenta, R_s también aumenta y los t_R disminuyen. Para ello se pueden efectuar algunas modificaciones:

1. Cambiar la composición de la fase móvil
2. Cambiar el pH de la fase móvil
3. Cambiar la composición de la fase estacionaria
4. Cambiar la temperatura de la columna (aumentar o disminuir)
5. Recurrir a algún efecto químico especial (equilibrios secundarios ej. impregnar el relleno de la columna con el ión plata).

El término 2 incluye el factor de capacidad k' ; su efecto en la resolución se puede apreciar en la gráfica No. 0. R_s puede aumentar su valor rápidamente si $k' < 1$, si $k' > 5$, R_s aumenta muy poco. Si k' es demasiado grande (≥ 10), los tiempos de retención son muy grandes y las bandas resultan dispersas por lo cual su detección y cuantificación llega a ser difícil. El rango óptimo de k' en términos de resolución, tiempos de retención y detección de las bandas es $1 < k' < 10$.

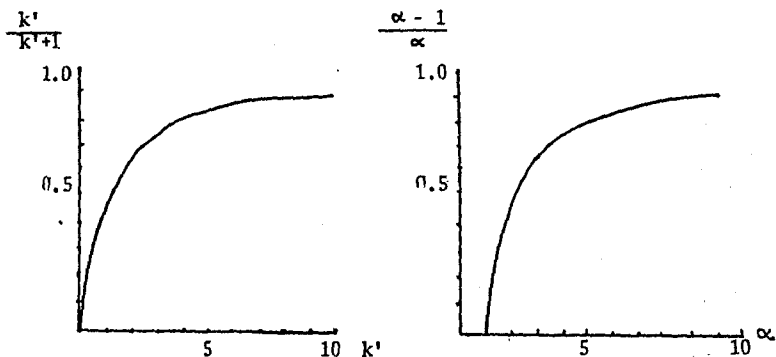
Los valores de k' son controlados por la fuerza del disolvente. El intervalo de valores de k' que proporciona una eficiencia óptima de la columna es $1 \leq k' \leq 5$ (23).

Si se tiene una mezcla en que las sustancias a analizar tienen valores de k' que difieren mucho entre sí y no pueden eluir con una k' en el rango óptimo, se requiere usar un gradiente de elución.

La eficiencia de la separación está medido por N (término 3). Se requiere aumentar 4 veces el valor de N para duplicar el valor de R_s . N puede incrementarse si:

1. Se aumenta la longitud de la columna
2. Se disminuye el flujo de la fase móvil
3. Se aumenta la temperatura de la columna.

Tomando en cuenta que $N = L/H$, se tiene que aumentar 4 veces el tamaño de la columna para duplicar el valor de R_s , lo cual no es práctico ya que la presión aumenta demasiado y los t_R también. Las opciones más usuales son la 2 y la 3.



Gráfica No. 0

2.4.2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC), es de especial importancia entre los métodos analíticos modernos. Mientras en un principio HPLC significaba "High Pressure Liquid Chromatography" (cromatografía de líquidos de alta presión), hoy el mundo es especializado entiende por HPLC más bien el término de CLAR (cromatografía líquida de alta eficiencia o alta resolución) debido a que la alta presión a la que se trabaja no es el único factor que determina las características de este método ya que la cuantificación, reproducibilidad y simplicidad se asocian con la nueva instrumentación, producto del avance tecnológico.

Dado el rápido desarrollo en los años pasados CLAR representa hoy un procedimiento estándar eficaz de análisis moderno.

La calidad de los materiales de los rellenos de columnas preparadas y las condiciones instrumentales posibilitan:

- * Selectividad óptima
- * Tiempo de análisis corto
- * Gran sensibilidad
- * Mayor reproducibilidad
- * Detección continua cuantitativa
- * Puede alcanzar una precisión mayor de $\pm 0.5\%$.

Para lograr los mejores resultados de los sistemas cromatográficos, es importante elegir la forma correcta para el desarrollo del análisis. A continuación se muestra la tabla No. 2 que se puede emplear para tal fin.

TABLA No. 2

	PROPIEDADES DE LA MUESTRA	TIPO DE CROMATOGRAFIA	EMPAQUE	FASE MOVIL		
MUESTRA	soluble en disolventes orgánicos	diferencia en p.m. 10%	CEM	malla de poliestireno	disolventes orgánicos de baja viscosidad (THF, tolueno)	
		Otras Diferencias	Fuertemente polar (soluble en MeOH, CHCl ₃)	Fase normal	grupos -CN o -NH ₂ unidos a la sílice	CH ₃ CN, H ₂ O, CHCl ₃ , heptano
			No polar (soluble en heptano, CHCl ₃)	Fase reversa	C ₁₈	Comenzar con MeOH y adicionar agua hasta que se alcance la fuerza del disolvente de la derecha
	PM < 2000		ADSORCION Fase normal	Sílica	Gradiente programado desde n-heptano hasta CH ₃ CN	
	Soluble en Agua	Electrolitos	Diferencias catiónicas	INTERCAMBIO IONICO	resina de intercambio iónico	Buffers 0.01 M pH 3.0-7.5. Fuerza muy iónica y pH para alcanzar la separación
			Diferencias aniónicas	Intercambio catiónico	resina de intercambio iónico	
No Electrolitos		Azúcares, políoles, Otros	FASE ESPECIALMENTE UNIDA	sílica	Comenzar con agua. Adicionar CH ₃ CN o MeOH para producir resolución Agua	
PM > 2000	Soluble en desolventes orgánicos	CEM	sílica	Solventes orgánicos de baja viscosidad (THF, tolueno)		
	Soluble en agua	CEM acuosa	sílica	Agua		

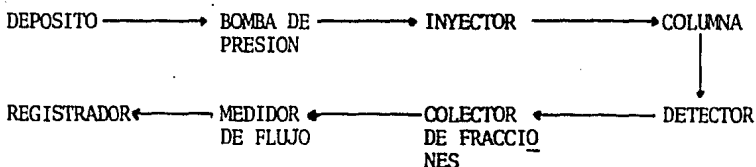
La CLAR se caracteriza por:

- * Columnas de diámetro pequeño (2.2 - 4.6 mm), longitud de 10 a 50 cm .
- * Introducción precisa de la muestra sin necesidad de usar volúmenes grandes.
- * Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy - bajos y detectar cantidades muy pequeñas.
- * Análisis rápidos
- * Alta resolución e
- * Instrumentos normalizados y automatizados.

2.4.3. INSTRUMENTACION

La instrumentación requerida para CLAR es relativamente simple, los - componentes se enlistan a continuación:

- * Depósito de la fase móvil
- * Sistema de inyección de la muestra
- * Columna
- * Detector
- * Registrados y procesador de datos



COLUMNAS: Es la parte del cromatógrafo que más nos interesa puesto que la resolución de los picos en un sistema cromatográfico está determina da por la separación lograda en la columna.

La fase estacionaria debe ser térmicamente estable y químicamente inerte con la fase móvil y con los solutos. La velocidad de la separación depende en gran parte del empaque de la columna.

Los requerimientos para los materiales de empaque de las columnas empleadas en CLAR incluyen:

1. Grandes superficies de contacto.
2. Una capa fina de adsorbente uniforme distribuida.
3. Superficies con estructuras abiertas, que sean de fácil acceso - para la fase móvil.
4. Estabilidad.
5. Dificultad para ser comprimidos por presiones altas.
6. Dificultad para ser desequilibrados por velocidades de flujo altas.

Los materiales de relleno de columnas pueden ser básicamente de dos tipos:

- a) Gel de sílice
- b) Geles de sílice modificados químicamente en la superficie con -- grupos orgánicos diferentes y por lo tanto con comportamiento de selectividad específico.
- c) Oxido de aluminio

Existen diferentes tipos de adsorbentes en los que las partículas del material de relleno puede ser irregular o esférico; totalmente poroso o superficialmente poroso. El tamaño de partícula puede variar de 5 a 15 μm , lo cual es importante, ya que de ello depende el área de contacto.

Las gels de sílice modificadas químicamente en la superficie se encuentran unidas con grupos funcionales como C_{18} , fenil, amino y ciano.

Existen empaques especiales para análisis de carbohidratos, triglicéridos y ácidos grasos.

Para cromatografía de intercambio iónico, existen columnas con fases unidas que permiten intercambio de aniones, cationes y aniones débiles

Las columnas pueden tener diferentes longitudes y diámetros dependiendo de la aplicación que se les dé (23). En la tabla siguiente se muestran algunos rellenos de columnas y sus aplicaciones:

Tab. 3 RELLENOS DE COLUMNA (FASES ESTACIONARIAS) Y FASES MOVILES MAS HABITUALES

TIPO	FASE ESTACIONARIA	FUNCIONALIZACION	FASES MOVILES	APLICACIONES	
ADSORCION	Gel de sílice	OH - Si - O - Si - OH	Hexano, cloroformo, isopropanol	Eteres, esterés, porfirinas, micotoxinas, vitaminas liposolubles	
	Alúmina	Al - O - Al	Hexano, cloroformo, isopropanol	Aminas	
REPARTO	FASE NORMAL	Amino	-NH ₂	Hexano, cloroformo, isopropanol	Azúcares, esteroides, nitroderivados
		Ciano	-CN	Hexano, cloroformo, isopropanol	Nitroderivados, aminoácidos
	FASES ENLAZADAS	Diol	Glicidoxietilmetoxisilano	Agua, Na ₂ HPO ₄ 0.1 M	Proteínas, péptidos, tensioactivos acuosos
		RP-2	Dimetilsilano	Agua, acetonitrilo, metanol	Aminas, fenoles, vitaminas hidrosolubles
		RP-8, C-8	Octilsilano	Agua, acetonitrilo, metanol	Catecolaminas, esteroides, aceites esenciales
FASE INVERSA	RP-18, ODS	Octadecilsilano	Agua, acetonitrilo, metanol	Analgésicos, ftalatos, aromáticos polinucleares	
INTERCAMBIO IONICO	Intercambiador fuerte de cationes	Acido sulfénico.	Na ₂ HPO ₄ 0,01-0,1 M	Vitaminas hidrosolubles, purinas, aminoácidos, nucleótidos	
	Intercambiador fuerte de aniones	Amonio cuaternario	Na ₂ HPO ₄ 0,01-0,1 M	Nucleótidos	
	Intercambiador débil de aniones	-NH ₂	H ₃ PO ₄ 0,01-0,05 M	Colorantes comestibles, carbohidratos	
EXCLUSION	Gel acuoso	Divinilbenceno sulfonado	Agua	Proteínas, péptidos, azúcares.	
	Gel orgánico	Divinilbenceno	Cloroformo, THF	Polímeros, gomas	
	Sílice de poro controlado	Gel de sílice	THF, alcoholes, agua	Polímeros, compuestos biológicos	
	Vidrio de poro controlado	Vidrio poroso	THF, alcoholes, agua	Compuestos biológicos.	

En Cl. de reparto, se pueden distinguir dos grupos: :

1. Cromatografía de fase normal y
2. Cromatografía de fase inversa.

En la figura siguiente se representan estos procesos, así como el orden de elución de los distintos componentes de la muestra en función de sus polaridades.

En el proceso de reparto cromatográfico de fase normal, el líquido estacionario es polar y el móvil es no polar y se emplea generalmente para separar compuestos altamente polares (23):

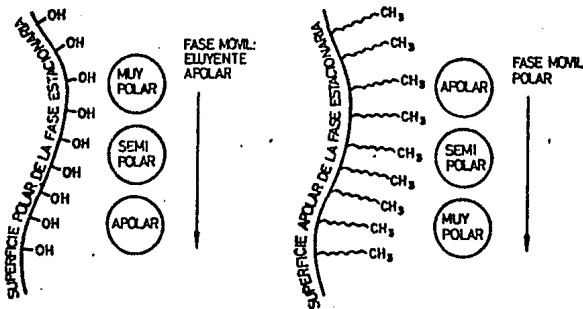


Fig. 1 Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

CROMATOGRAFIA DE FASE ENLAZADA

La ventaja principal que ofrece la cromatografía de fase enlazada es que los rellenos de las columnas son más estables que los usados en cromatografía líquido - líquido ya que la fase estacionaria está unida químicamente al soporte y no puede ser removida fácilmente durante su uso. Con este tipo de rellenos es posible usar disolventes dentro de un intervalo de pH de 2 a 8.5. Algunos materiales de relleno pueden soportar temperaturas mayores a los 80°, aunque se usan generalmente temperaturas entre T.A. y 60° C.

Este tipo de cromatografía es adecuada para analizar muestras que contienen componentes con factores de capacidad que varían en una gran proporción, por lo cual requieren gradiente de elución para su análisis por cromatografía de líquidos.

Existe una amplia variedad de rellenos de fase enlazada a diferentes grupos funcionales que permite llevar a cabo cromatografía de fase normal y fase inversa.

En cromatografía de fase normal se usan rellenos polares de la misma manera que los adsorbentes para cromatografía líquido-sólido (ej. sílica). Es posible efectuar separaciones de muestras que contienen sustancias de polaridad moderada a polaridad fuerte mediante el uso de rellenos no polares (ejem. C₈ ó C₁₈) en conjunción con fases móviles acuosas polares para separar una variedad amplia de solutos menos polares.

Los compuestos de carácter iónico se pueden separar mediante la cromatografía de fase enlazada.

tografía de pares iónicos.

La cromatografía de fase enlazada es particularmente útil para separar componentes que tienen pesos moleculares diferentes (ej. homólogos), - siempre y cuando el peso molecular sea menor a 3000.

El mecanismo de retención no ha sido establecido definitivamente. Se propone que las moléculas de la muestra se adsorben en la superficie de la cubierta orgánica la cual cubre la sílica o bien que las moléculas de la muestra se absorben dentro de una fase "líquida" definida -- por la cubierta orgánica y las moléculas asociadas a la fase móvil.

En el caso de un mecanismo de adsorción se supone que las moléculas de la muestra y el solvente compiten por un lugar en la superficie orgánica. Se ha sugerido que los sustituyentes dimetilalquilo en los rellenos de fase inversa, pueden actuar como cristales líquidos formando - una fase líquida ordenada. Otra sugerencia es que la cubierta orgánica embebe ciertos componentes de la fase móvil para formar una fase estacionaria líquida convencional.

Es conveniente considerar a la fase orgánica enlazada como si fuera equivalente a una fase líquida sostenida mecánicamente a una fase sólida (23).

Elección de la fase móvil: Los valores de k' para los solutos se controlan generalmente cambiando la fuerza eluyente de la fase móvil, o bien variando la fase estacionaria.

La combinación de la fase móvil y estacionaria controlan el rango total de los valores de k' del soluto para un sistema particular de CLAR.

La fase móvil se puede variar sistemáticamente para optimizar los factores de separación.

Otro factor que hay que tomar en cuenta es la selectividad del disolvente, la cual está dada por sus características químicas (momento dipolo, aceptores de electrones o donadores de electrones). La fuerza del disolvente es controlada mediante P' (polaridad de Snyder). El valor de P' varía entre -2 y 10.2, entre mayor sea este valor, mayor será la polaridad del disolvente.

Al aumentar P' en cromatografía de fase normal, aumenta la fuerza de la fase móvil y disminuyen los factores de capacidad k' de los componentes de la muestra. La ecuación siguiente muestra la relación entre k' y P' :

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_1 - P'_2) / 2}$$

Donde k'_1 y k'_2 son los valores inicial y final de k' para un compuesto dado y P'_1 y P'_2 se refieren a los valores inicial y final de P'.

Las fases móviles usadas en este tipo de cromatografía, están constituidas por mezclas de disolventes hidrocarbonados como hexano, heptano o isooctano y cantidades pequeñas de otro de mayor polaridad.

La fuerza de la fase móvil se puede modificar variando la concentración del disolvente más polar.

Para cromatografía de fase inversa se tiene:

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1) / 2}$$

Las fases móviles usadas en fase inversa están usualmente constituidas por agua a la cual se le adiciona concentraciones variables de disolventes orgánicos miscibles como MeOH, CH₃CN, THF, etc.

Otra alternativa para ambas clases de cromatografía es el uso de fases ternarias o incluso cuaternarias.

El pH puede cambiar la selectividad de la separación para solutos ionizados o ionizables, puesto que las moléculas cargadas se distribuyen preferentemente en la fase acuosa o en la más polar, por lo cual es posible controlar el coelución de los picos amortiguando la fase móvil, o bien adicionando pequeñas cantidades de ácidos minerales (acético, fosfórico, etc).

En ciertas ocasiones se adicionan algunas sales a la fase móvil en cromatografía de fase inversa para variar el tiempo de retención del soluto, la selectividad o bien mejorar la simetría de pico. Esto es el resultado de otros equilibrios que se presentan del tipo ácido-base (carbonato de amonio), complejación (nitrato de plata) o formación de pares iónicos (nitrato de tetrabutil amonio) .

2.5. DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO POR CLAR:

Para el desarrollo de un método analítico por CLAR generalmente se siguen una serie de pasos, entre los cuales se encuentran:

1. Investigación bibliográfica
2. Investigación de propiedades físicas y químicas de las sustancias a separar:
 - peso molecular
 - solubilidad
 - espectros de absorción visible y U.V.
 - polaridad
 - naturaleza química (ácido, base, sal, amina, etc.)
 - coeficiente de partición
 - estabilidad
 - propiedades electroquímicas
 - índice de refracción, etc.
3. Selección del tipo de CLAR en base a la investigación anterior.
4. Selección del detector
5. Desarrollo del sistema con el fin de:
 - obtener tiempos de retención cortos.
 - evitar presiones elevadas que puedan dañar la columna y el equipo.
 - obtener factores de resolución mayores de dos.
 - obtener un método con una tolerancia adecuada.
 - obtener un método de costo aceptable.

6. Preparación de la muestra
7. Procedimiento de validación estadística
8. Comparación de resultados contra los obtenidos por métodos ya establecidos.

2.6 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

El término de validación se puede definir como la determinación del grado de valor de un proceso y se puede tomar como significado alternativo el "hacer válido" un proceso, en el sentido de producir el resultado deseado.

El objetivo de una validación es demostrar estadísticamente que el método es preciso, exacto y específico.

La forma de validar un método analítico depende de la aplicación que se le va a dar (control de calidad, estudios de estabilidad o análisis de proceso), de los requerimientos gubernamentales, y desde luego del criterio de la persona que la realiza.

A continuación se propone una guía para validar métodos analíticos:

I. Linealidad del sistema: debe demostrarse que la relación entre la concentración del estándar y la respuesta del detector sigue una relación matemática definida y constante. Se busca que la función sea lineal.

Se le llama linealidad, al grado en el que la curva de calibración a-

nalítica se aproxima a la función matemática, o al grado en que la sensibilidad es constante. Cuando se determina la linealidad se debe especificar:

a) la sensibilidad del sistema: es igual a la pendiente de la curva de calibración analítica expresada como la relación del cambio de la señal al cambio de concentración de la sustancia analizada.

b) rango analítico: indica la concentración más alta y la más baja de la sustancia, que se ajusta a la función matemática que relaciona la respuesta del detector con la concentración, o el rango de concentraciones en que se estudió esta respuesta.

La curva de calibración se determina por análisis duplicados de estándares, usualmente en concentraciones que varían entre el 60 y 140% del valor esperado en la muestra.

La curva resultante se debe presentar con los datos obtenidos y con el valor del coeficiente de correlación (r). Cuanto más cercano a la unidad se encuentra el valor de " r " más lineal será el método. También se busca que el intercepto al origen tienda a 0.

II. Precisión: grado de concordancia mutua entre los resultados obtenidos en una serie de ensayos. Se expresa como la desviación estandard o bien como la desviación estandard relativa o coeficiente de variación (DER):

$$DER = 100 DE/X$$

DER = desviación estandard relativa

DE = desviación estandard

x = media

La precisión del sistema se demuestra analizando un cierto número de veces la misma solución standard. Los experimentos se evalúan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ que equivale a DER=2% .

La precisión de un método se expresa como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas y como la concordancia obtenida entre determinaciones efectuadas por diferentes analistas en diferentes días o en diferentes laboratorios, utilizando diferentes equipos.

III. Especificidad (selectividad): es el grado en el cual la medición es debida solo a la sustancia a ser determinada y no a otra u otras sustancias que pueden estar presentes en el material sujeto a análisis dependiendo de la aplicación del método se requerirá mayor o menor grado de especificidad, por ejemplo, en un método indicativo de estabilidad se requerirá separar y determinar los productos de degradación del activo y/o los excipientes.

IV. Exactitud (llamado sesgo): es la concordancia entre un valor experimental determinado y el valor de referencia aceptado. Si el método, estadísticamente no tiene sesgo, entonces es exacto.

Cuando no es así, se hacen pruebas repetidas para establecer la magnitud del sesgo, y se utiliza como un factor de corrección, sino puede ser eliminado.

La exactitud del método se puede demostrar mediante dos experimentos.

a) Efecto placebo: es la exactitud de un método expresado como la --

concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista en muestras preparadas con la misma cantidad de placebo, añadiendo diferentes cantidades de una solución estandar de la sustancia que se va a determinar a diferentes concentraciones que varían en un intervalo del 60 al 140% del nivel normal de análisis.

b) Linealidad del método: se lleva a cabo analizando muestras de diferente tamaño (del 60 al 140% con respecto a lo estipulado en el método analítico).

Este experimento indica el efecto que puede tener la presencia de las sustancias auxiliares en la formulación (excipientes o vehículos), -- cuando en alguna ocasión se modifica la cantidad de muestra empleada para el análisis, o cuando ha habido un error en la manufactura del producto.

V. Comparación de métodos: cuando se proponen métodos nuevos para reemplazar los que ya están establecidos, se lleva a cabo la comparación de ellos, utilizando los parámetros mencionados: exactitud, precisión, determinados de la forma descrita.

El método propuesto no necesita ser estadísticamente idéntico al método establecido, siempre y cuando cumpla con todos los requerimientos de validación necesarios.

Para efectuar este reemplazo se deben considerar otros factores adicionales: costo, facilidad de implementación, disponibilidad de equipo, personal capacitado, etc.

VI. Estabilidad de la muestra: este experimento tiene por objeto -

estudiar la estabilidad de la muestra lista para ser inyectada en el cromatógrafo, ya que en algunas ocasiones no es posible llevar a cabo el análisis el mismo día en que se preparó la muestra. Se lleva a cabo analizando la muestra el mismo día de su preparación así como siete días después, conservándola a temperatura ambiente y en refrigeración. A partir de los datos obtenidos se puede establecer el tiempo en que es posible inyectar dicha muestra sin alterar los resultados.

VII. Tolerancia: una vez establecido los parámetros críticos, es necesario conocer el efecto de su variación en los resultados. Estos parámetros pueden ser relación de solventes en la fase móvil, cambio de una columna vieja por una nueva o viceversa, flujo, etc.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DESARROLLO DEL SISTEMA

Los sistemas más usuales en CLAR para cuantificar parabenos, usan columnas de fase inversa y fases móviles constituidas por MeOH /H₂O y CH₃CN /H₂O en diferentes proporciones (1,2,6,10,12-15,19,20,22,25,27) El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema que permita - cuantificar metilparabeno (MP), propilparabeno (PP) y alcohol bencílico (AB) en la misma inyección. En las muestras se espera encontrar la presencia de benzaldehído (BZ) y prednisolona alcohol (PA), - como elementos contaminantes o como productos de degradación del alcohol bencílico y el acetato de prednisolona respectivamente.

El metilparabeno se encuentra en una concentración 1.80 mg. /ml. y - el alcohol bencílico en una concentración de 9.0 mg /ml.

Inicialmente se probaron las columnas μ -Bondapak C₁₈ y μ -Bondapak CN y fases móviles que contenían MeOH /H₂O y CH₃CN /H₂O en un intervalo de 30 a 60% de fase orgánica.

En el caso de la columna C₁₈ se obtuvieron los mejores resultados utilizando las fases móviles MeOH /H₂O 50:50 y CH₃CN /H₂O 35:65 sin embargo en el primer caso no se resuelve el benzaldehído ni la prednisolona alcohol y en el segundo caso no se resuelve la prednisolona alcohol, ya que tiene el mismo tiempo de retención que el metilparabeno.

Finalmente se probó la columna μ -Bondapak fenil. Se experimentó con fases binarias constituidas por MeOH /H₂O, EtOH/H₂O y CH₃CN /H₂O en un intervalo de un 30 a un 60% fase orgánica.

Se estudió el efecto del pH en la separaciones de los componentes de la muestra, para lo cual se probaron soluciones amortiguadoras de -- fosfatos y acetatos en una concentración 0.01 M. Se encontró que ca si no se afectan los factores de resolución pero que si mejora la -- forma de los picos, sobre todo el pico correspondiente al propilparabeno (PP).

El mejor resultado se obtuvo con MeOH /solución amortiguadora de acetatos 0.01 M 31:69 y como estandard interno el etilparabeno (EP).

El sistema propuesto, que se muestra en la tabla No. 4 , se le estudió su tolerancia. Es importante conocer este parámetro, ya que los tiempos de retención de una sustancia son afectados al variar la proporción de la fase móvil. En la tabla No. 5 se muestra el efecto de las diferentes proporciones de la fase móvil en los factores de resolución de los picos y en los tiempos de retención de los compuestos (tolerancia del sistema).

En los resultados se aprecia que al incrementar la proporción de fase orgánica disminuyen los tiempos de retención así como los factores de resolución entre los diferentes picos.

En base a los resultados obtenidos se puede apreciar que nuestro sistema es tolerante a pequeños cambios en la composición de la fase móvil en el punto central (31:69).

Una vez desarrollado el sistema, se procedió a la validación estadística del mismo, en el que se demuestra precisión, exactitud y especificidad.

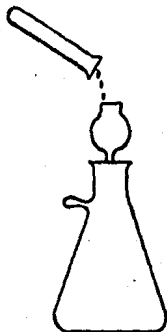
PARAMETROS INSTRUMENTALES

TABLA No. 4

1. INSTRUMENTOS:	CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS
2. COLUMNA:	U BONDAPAK FENIL 30 CM X 3.9 MM D.I. DE ACERO INOXIDABLE
3. DETECTOR:	U.V. FIJO 254 NM
4. FASE MOVIL:	CH ₃ OH/SOLUCION AMORTIGUADORA DE ACETATOS 0.01 M. 31:69.
5. FLUJO:	2 ML/MIN
6. TIEMPOS DE RETENCION APROXIMADOS:	ALCOHOL BENCILICO: 4.0 MINUTOS BENZALDEHIDO: 6.7 MINUTOS METILPARABENO: 8.0 MINUTOS ETILPARABENO: 14.2 MINUTOS PROPILPARABENO: 27.8 MINUTOS PREDNISOLONA ALCOHOL: 35.8 MINUTOS

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Fig. No. 2



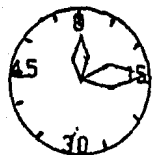
FILTRAR LA SUSPENSION A TRAVES DE UN FILTRO DE VIDRIO POROSO No. 3F



ANADIR UNA ALICUOTA DE 5 ML A UN MATRAZ VOLUMETRICO DE 25 ML



AGREGAR 5ML DEL ESTANDAR INTERNO Y 1.5 ML DE ACETONA.



DEJAR EN REPOSO 1.5 MINUTOS ANTES DE LLEVAR A VOLUMEN CON METANOL.



FILTRAR A TRAVES DE PAPEL FILTRO WHATMAN No. 42.



INYECCIONAR 15 μ L AL CROMATO GRAFO.

TABLA No. 5

TOLERANCIA DEL SISTEMA

RELACION MEOH/ACETATO
DE SODIO 0,01 M EN LA
FASE MOVIL

TIEMPOS DE RETENCION

	AB	BZ	MP	EP	PP	PA
28/72	4.30	7.6	9.3	17.2	41.4	56.0
31/69	3.97	6.7	7.8	13.9	27.2	35.8
34/66	3.65	5.9	6.6	11.0	20.4	24.6

FACTORES DE RESOLUCION

	AB/BZ	BZ/MP	MP/EP	EP/PP	PP/PA
28/72	5.10	1.46	4.26	8.56	3.41
31/69	3.82	1.04	4.16	6.56	2.34
34/66	2.56	0.93	2.95	4.72	1.68

3.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTANDARD.

1. Agua grado HPLC
2. Metanol grado HPLC
3. Acetona
4. Acetato de Sodio
5. Fase móvil: metanol/acetato de sodio 0.01 M en una relación ---
31:69
 - 5.1 disolver el acetato de sodio en 1000 ml. de agua grado HPLC para hacer una solución 0.01 M.
 - 5.2 mezclar 69 partes de la solución de acetato de sodio 0.01 M obtenida en el paso 5.1 con 31 partes de metanol grado HPLC
 - 5.3 filtrar y degasificar.
6. Solución de standard interno: pesar exactamente 20 mg. de etil parabeno en un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y diluir al - volumen con metanol.
7. Solución standard de referencia de alcohol bencílico: pesar -- exactamente 100 mg de alcohol bencílico standard de referencia en - un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y llevar a volumen con me tanol.
8. Solución standard de referencia de metilparabeno: pesar exacta mente 180 mg standard de referencia en un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y llevar a volumen a metanol.
9. Solución standard de referencia de propilparabeno: pesar exac tamente 20 mg de propilparabeno standard de referencia en un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y llevar a volumen con metanol.
10. Solución standard factor respuesta: combinar las siguientes --

alícuotas en un matraz volumétrico de 25 ml:

- 5 ml de solución de estándar interno (EP).
- 5 ml de solución estándar de referencia de alcohol bencílico (AB).
- 5 ml de solución estándar de referencia de metilparabeno (MP).
- 5 ml de solución estándar de referencia de propilparabeno (PP).

Llevar a volumen con metanol.

3.3 VALIDACION DEL METODO ANALITICO:

Para validar el método analítico se realizaron los siguientes experimentos:

1. Especificidad
2. Linearidad del sistema
3. Precisión del sistema
4. Precisión del método
5. Exactitud del método
6. Estabilidad de la muestra

Todas las muestras a analizar en este estudio se trataron como se muestra en la figura No.2 . El objetivo de añadir la acetona es precipitar el agente suspensor presente en la formulación, ya que éste daña la columna.

Los cálculos en general se hicieron de la forma siguiente, usando para los factores respuesta las áreas obtenidas de soluciones estándar y para el cálculo de la concentración de los diversos conservadores,

las áreas obtenidas de las muestras problema.

$$K_{MP} = \frac{\text{Area MP}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{100} \times \frac{5}{25} \times \frac{100}{\text{Peso MP}} \times \frac{25}{5}$$

$$K_{MP} = \frac{\text{Area MP}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{\text{Peso MP}}$$

$$\text{mg MP/ml} = \frac{\text{Area MP}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{100} \times \frac{5}{25} \times \frac{25}{V(\text{ml})} \times \frac{1}{K_{MP}}$$

donde K_{MP} = factor respuesta del metilparabeno

V = volumen de la alicuota de muestra (ml).

$$K_{PP} = \frac{\text{Area PP}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{100} \times \frac{5}{25} \times \frac{100}{\text{Peso PP}} \times \frac{25}{5}$$

$$K_{PP} = \frac{\text{Area PP}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{\text{Peso PP}}$$

$$\text{mg PP/ml} = \frac{\text{Area PP}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{100} \times \frac{5}{25} \times \frac{25}{V(\text{ml})} \times \frac{1}{K_{PP}}$$

$$K_{AB} = \frac{\text{Area AB}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{100} \times \frac{5}{25} \times \frac{100}{\text{Peso AB}} \times \frac{25}{5}$$

$$K_{AB} = \frac{\text{Area AB}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{\text{Peso AB}}$$

$$\text{mg AB/ml} = \frac{\text{Area AB}}{\text{Area EP}} \times \frac{\text{Peso EP}}{100} \times \frac{5}{25} \times \frac{25}{V(\text{ml})} \times \frac{1}{K_{AB}}$$

ESPECIFICIDAD: se prepararon muestras de las siguientes soluciones y

suspensiones con el fin de observar si había interferencia debidas a los excipientes y/o productos de degradación:

1. Solución estándar de referencia conteniendo AB, MP, PP, BZ y EP.
2. Solución estándar de referencia conteniendo AB, MP, PP, BZ, EP y PA.
3. Placebo total
4. Placebo de alcohol bencílico (AB)
5. Placebo de propilparabeno (PP)
6. Placebo de metilparabeno (MP)
7. Placebo de acetato de prednisolona sin estándar interno (EP)
8. Placebo de acetato de prednisolona con estándar interno (EP)
9. Suspensión total sin estándar interno (EP)
10. Suspensión total con estándar interno (EP)

Se inyectaron dichas muestras y se observó en los cromatogramas la ausencia de interferencias. Los cromatogramas se muestran al final del capítulo (figuras de la 3 a la 12). Este experimento demostró que este sistema es específico a temperatura ambiente.

LINEALIDAD DEL SISTEMA: Esta prueba se llevó a cabo usando soluciones estándar de AB, MP y PP preparadas en un intervalo de concentración del 60 al 140% de la concentración teórica presente en la formulación.

Se determinó la relación de áreas entre cada uno de los conservadores y el estándar interno (EP).

Los resultados se muestran en las gráficas No. 1, 2 y 3. En ellas se puede apreciar que la respuesta del detector es lineal en este in

tervalo de concentraciones, cumpliendo la ecuación de una línea recta $y=mx+b$. En todos los casos los factores de correlación son muy próximos a la unidad y las ordenadas al origen se encuentran muy - cercanas al cero.

PRECISION DEL SISTEMA: la precisión del sistema para metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico se demostró inyectando 6 veces - la solución estándar al 100% de lo estipulado para el análisis. Se determinó el factor respuesta en cada caso. Los resultados se mues- tran en la tabla No.6.

A partir de ellos se puede concluir que el sistema es preciso, ya - que se obtuvo en todos los casos una DER menor al 2%.

PRECISION DEL METODO: Se llevo a cabo este experimento analizando 3 muestras de la suspensión inyectable en dos días diferentes por dos químicos diferentes; en total se analizaron 12 muestras para deter- minar la precisión del método para metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico. Los resultados obtenidos en la tabla No. 7, de- muestran que el método desarrollado es preciso, ya que se obtiene - una DER menor al 2%.

EXACTITUD DEL METODO: la exactitud del método se demostró mediante 2 experimentos que se denominan:

a) Efecto placebo: en esta parte de la validación, se analizaron - muestras de placebo de conservadores a las que se les añadió solucio- nes estándar de metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico -

en diferentes proporciones para tener 60, 80, 100, 120 y 140% de las concentraciones normales de los conservadores.

Este experimento indica el efecto que puede tener la presencia de las sustancias auxiliares de la formulación en el análisis de los conservadores. Los resultados se muestran en la tabla No.8.

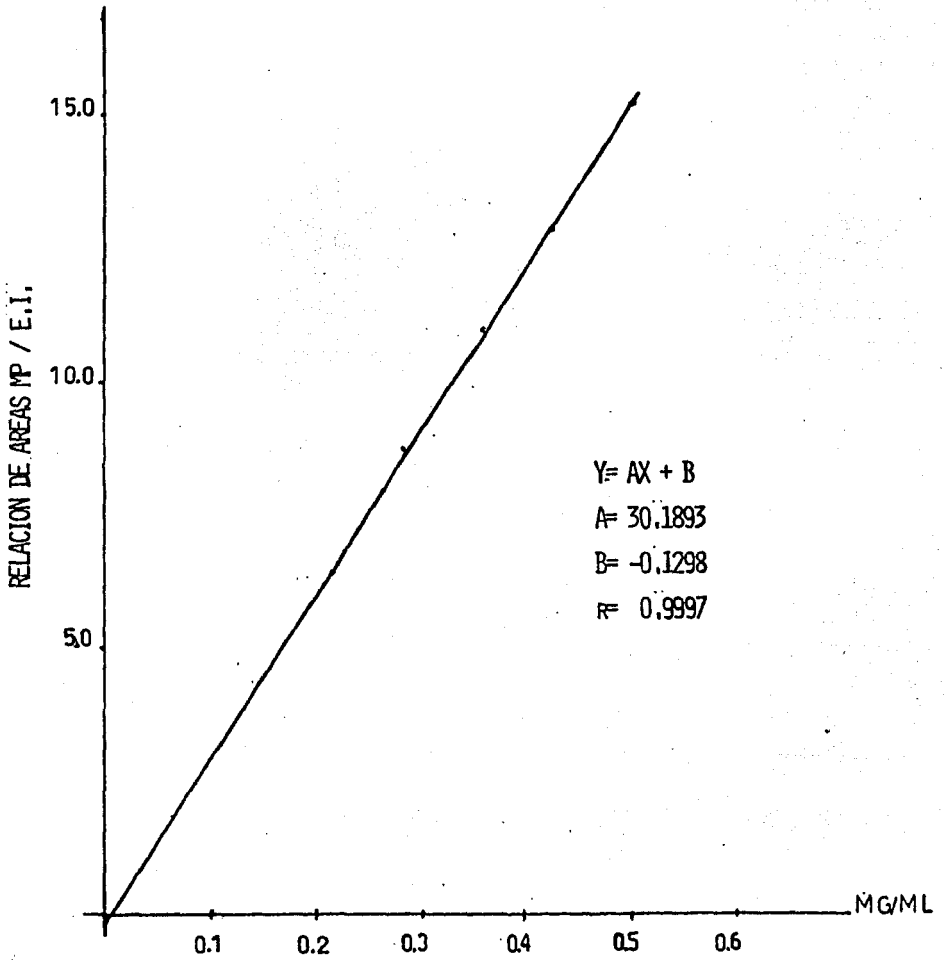
b) Linealidad de la muestra: en este experimento se analizaron muestras correspondientes a un 60, 80, 100, 120 y 140% del tamaño normal de la muestra. Los datos se presentan en la tabla No. 9.

Estos dos experimentos permitieron demostrar que el método propuesto es exacto para cuantificar los 3 conservadores en la misma inyección.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA: muestras de la solución listas para ser inyectadas en el cromatógrafo obtenidas en el experimento de reproducibilidad (precisión del método), se mantuvieron a temperatura ambiente y en refrigeración. Se cuantificaron siete días después del análisis inicial para establecer su estabilidad. Este experimento es importante ya que en algunas ocasiones no es posible inyectar la muestra el mismo día de su preparación y se requiere saber cuantos días después de la preparación de la muestra es aún posible inyectarla con seguridad de que es estable y no se van alterar los resultados que se obtengan. Los resultados se muestran en la tabla No. 10.

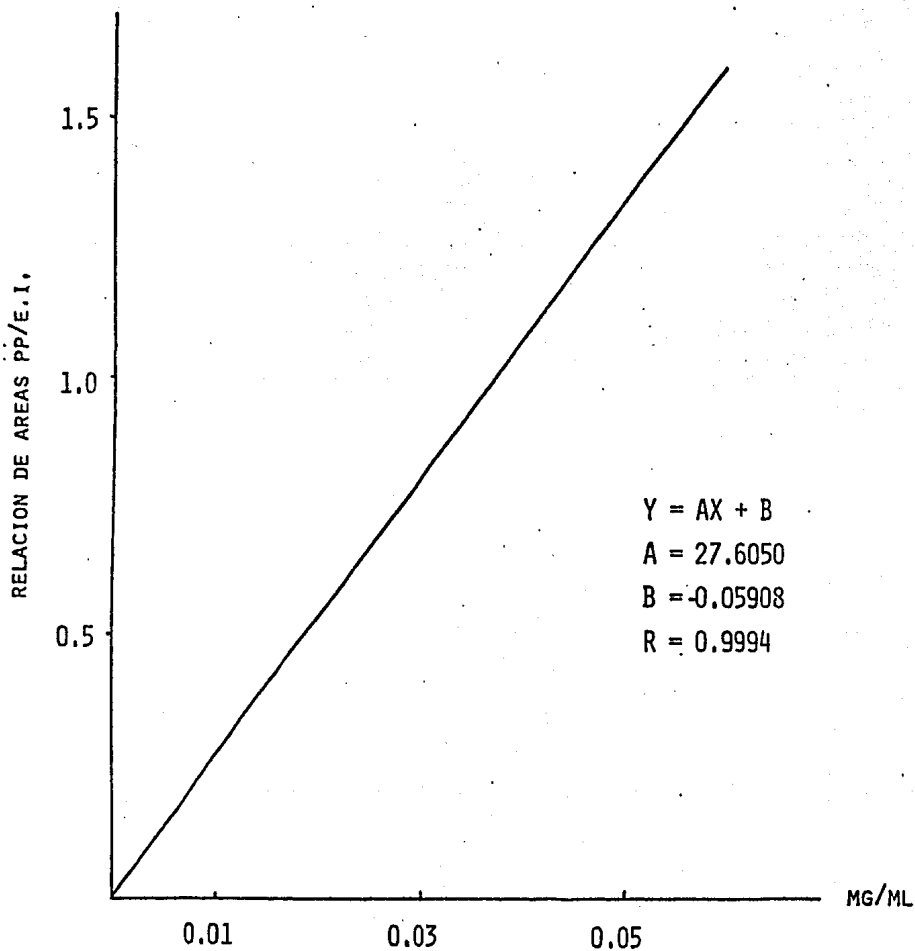
En base a los resultados obtenidos se puede asegurar que la muestra lista para ser inyectada en el equipo es estable al menos siete días después de su preparación, si se mantiene a temperatura ambiente o en refrigeración.

LINEARIDAD METILPARABENO



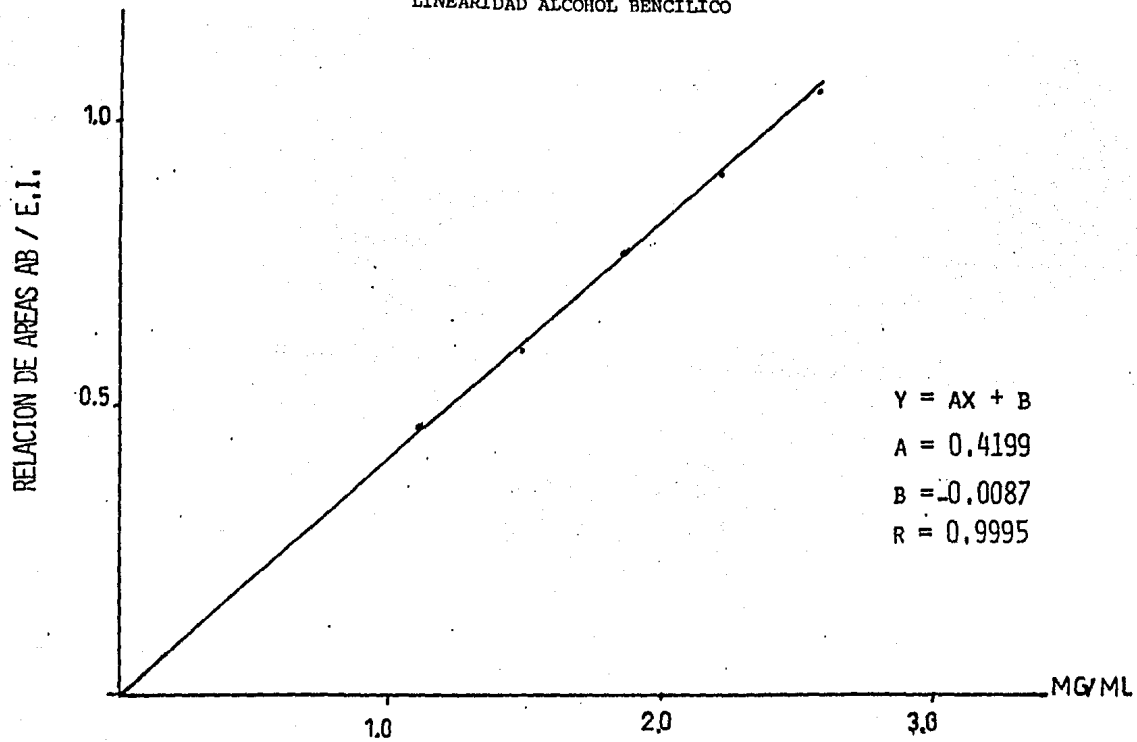
GRAFICA No. 1.

LINEARIDAD PROPILPARABENO



GRAFICA No. 2.

LINEARIDAD ALCOHOL BENCILICO



GRAFICA No. 3

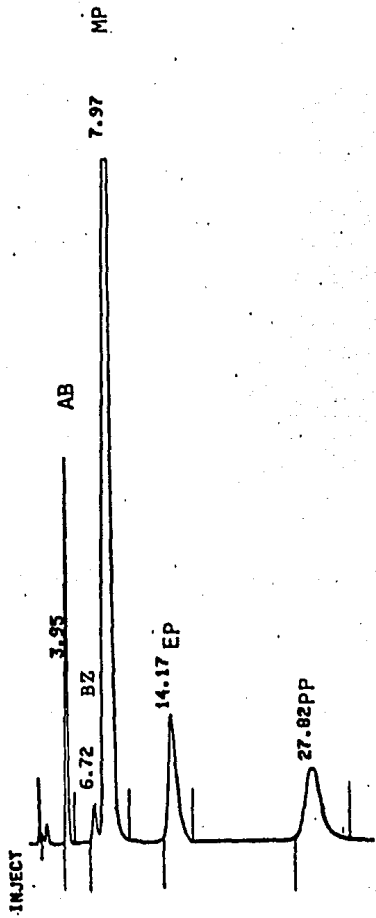


Fig. No. 3
ESTANDAR DE REFERENCIA

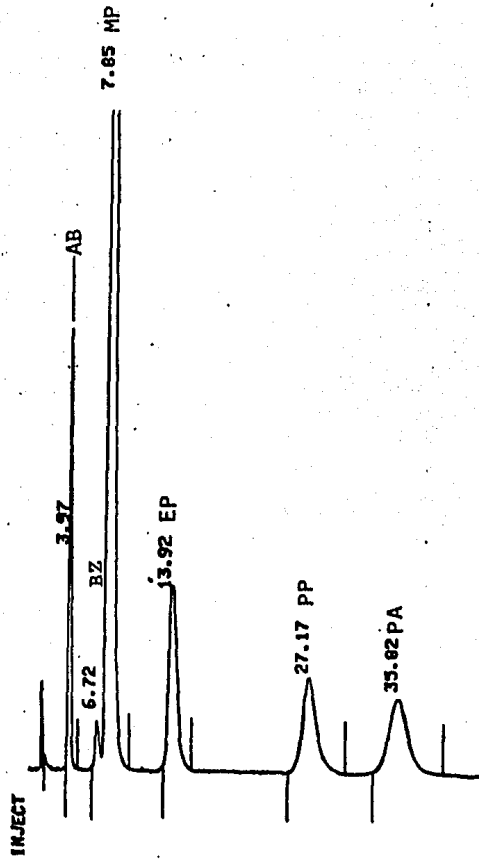


Fig. No. 4
ESTANDAR DE REFERENCIA CON PRED-
NISOLONA ALCOHOL

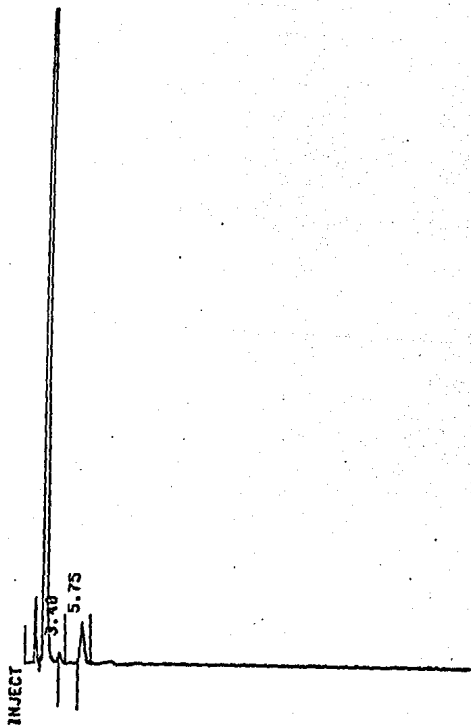


Fig. 5
PLACEBO TOTAL

55

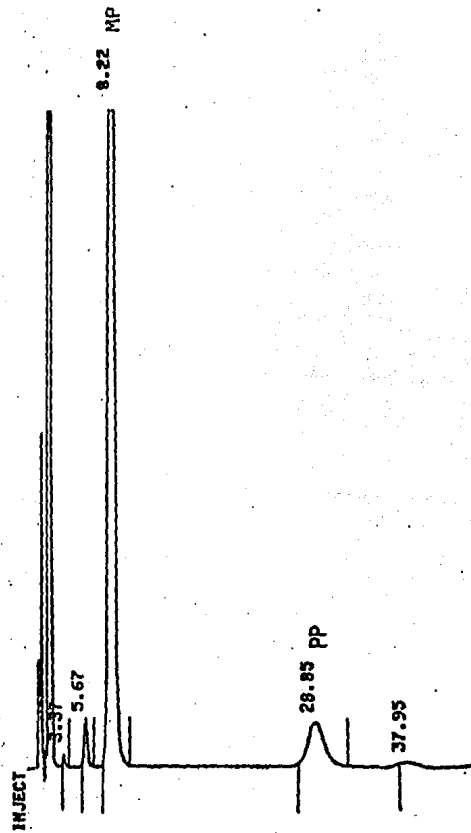


Fig. 6
PLACEBO DE ALCOHOL BENCILICO

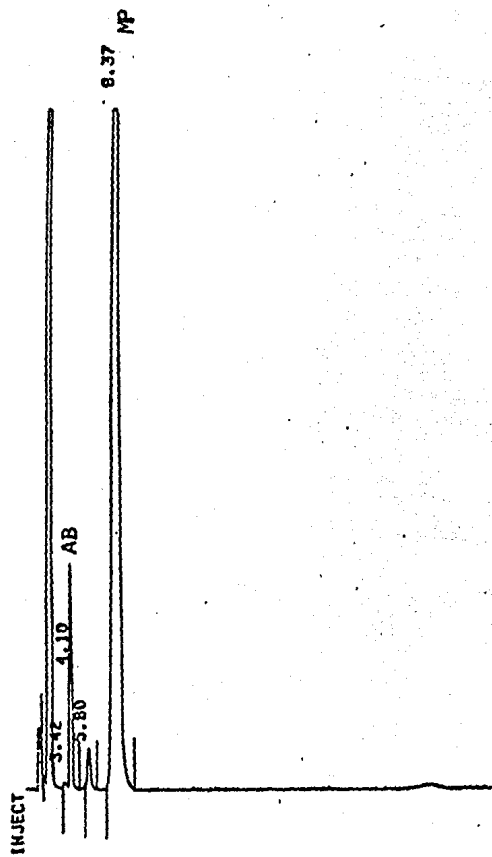


Fig. 7
PLACEBO DE PROFILPARABENO

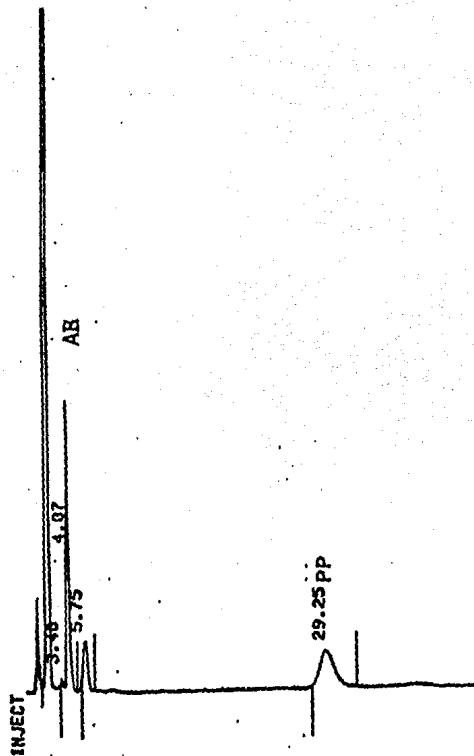
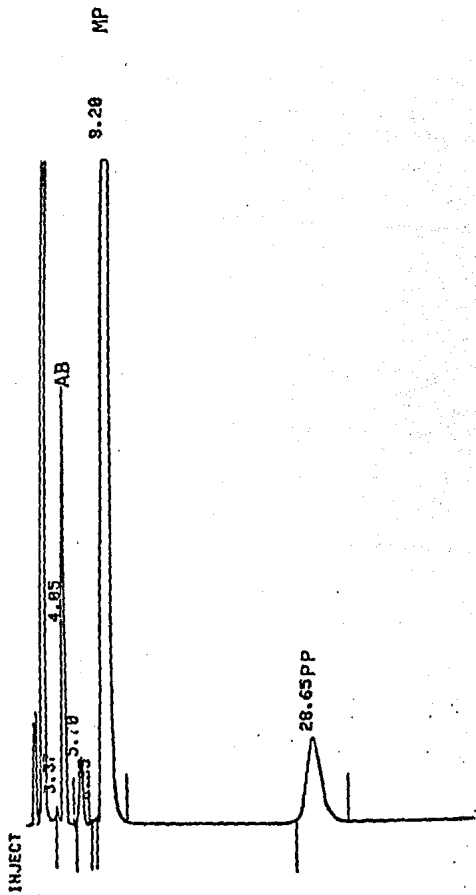


Fig. 8
PLACEBO DE METILPARABENO



55 Fig. 9
SUSPENSION TOTAL SIN ESTANDAR INTERNO

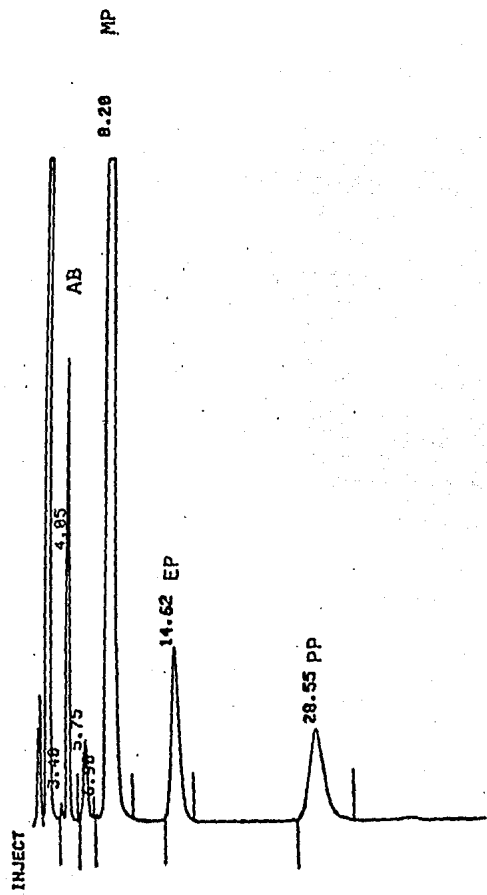


Fig. 10
SUSPENSION TOTAL CON ESTANDAR INTERNO

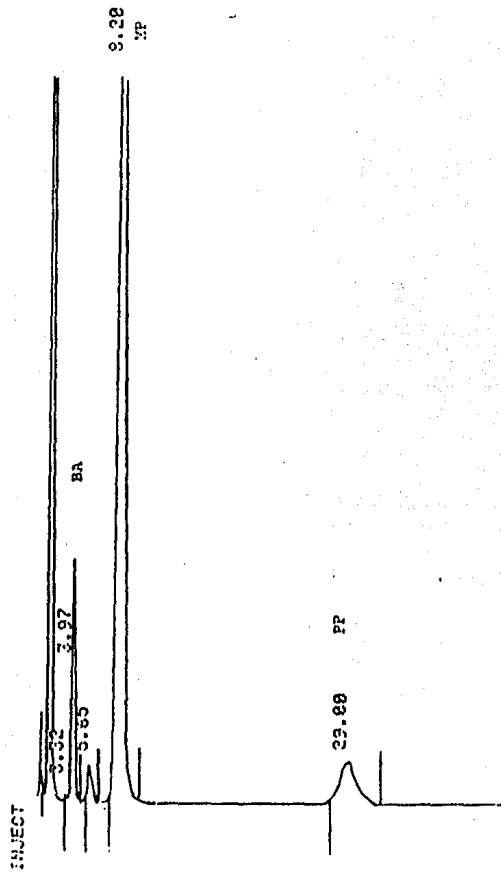


Fig. 11
PLACEBO DE ACETATO DE PREDNISOLONA
SIN ESTANDAR INTERNO

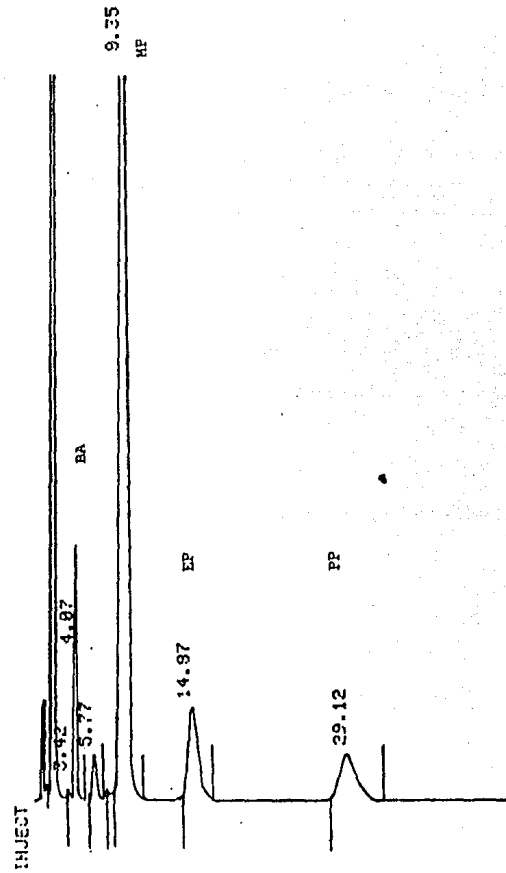


Fig. 12
PLACEBO DE ACETATO DE PREDNISOLONA
CON ESTANDAR INTERNO

TABLA NO. 6.

PRECISION DEL SISTEMA

MUESTRA NO.	METILPARABENO K*	PROPILPARABENO K*	ALCOHOL BENCILICO K*
1	1.07646	0.93379	0.01402
2	1.08152	0.94932	0.01415
3	1.07637	0.92672	0.01424
4	1.08054	0.93465	0.01432
5	1.08171	0.93902	0.01434
6	1.07347	0.93261	0.01427
X	1.07835	0.93601	0.01422
D.E.	0.0034	0.00763	0.00012
D.E.R.	0.32 %	0.81 %	0.85 %

$$K^* = \frac{\text{AREA EST. ANALITICO}}{\text{AREA EST. INT.}} \times \frac{\text{PESO EST. INT. X FACTOR DE DILUCION EST. INT.}}{\text{PESO EST. ANAL. X FACTOR DE DILUCION EST. ANAL.}}$$

TABLA No. 7

PRECISION DEL METODO

<u>MUESTRA</u>	<u>DIA</u>	<u>QUIMICO</u>	<u>% M P</u>	<u>% P P</u>	<u>% A B</u>
1	1	1	98,32	100,42	96,47
2	1	1	98,26	100,41	96,33
3	1	1	98,47	98,98	99,76
4	1	2	98,33	102,31	97,80
5	1	2	97,71	99,63	96,95
6	1	2	97,90	100,75	99,51
7	2	1	99,35	100,72	97,01
8	2	1	99,59	100,39	96,94
9	2	1	100,22	101,84	97,58
10	2	2	97,77	100,03	96,15
11	2	2	99,97	101,25	97,61
12	2	2	98,83	99,44	97,24
		X =	98,66	100,51	97,44
		D.E.=	0,91	0,95	1,14
		D.E.R.=	0,92%	0,95%	1,17%

TABLA No. 8.

EXACTITUD DEL METODO

<u>% DEL CONSERVADOR RESPECTO AL ESTIPULADO</u>	<u>% RECUPERADO METILPARABENO</u>	<u>% RECUPERADO PROPILPARABENO</u>	<u>% RECUPERADO ALC. BENCILICO</u>
60	98.12	99.94	98.18
80	99.73	101.32	98.97
100	100.03	101.92	100.50
120	98.83	101.20	100.69
140	100.01	99.14	100.50
\bar{X}	99.34	100.70	99.77
D.E.	0.84	1.13	1.13
D.E.R.	0.85 %	1.12 %	1.13 %

TABLA No. 9.

LINEARIDAD DE LA MUESTRA

% DEL TAMAÑO NORMAL DE LA MUESTRA	VOL. DE LA MUESTRA ML	% RECUPERADO METILPARABENO	% RECUPERADO PROPILPARABENO	% RECUPERADO ALC. BENCILICO
60	3	97.63	99.78	97.44
80	4	97.06	100.05	95.88
100	5	99.62	101.78	95.82
120	6	98.95	101.38	97.52
140	7	99.26	103.04	95.51
\bar{X}		98.50	101.21	96.43
D.E.		1.10	1.33	0.96
D.E.R.		1.12 %	1.32 %	1.00 %

TABLA No. 10.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRAS

MUESTRA	ANALISIS INICIAL			ANALISIS 7 DIAS DESPUES					
	% MP	% PP	% AB	TEMP. AMBIENTE			REFRIGERACION		
	% MP	% PP	% AB	% MP	% PP	% AB	% MP	% PP	% AB
1	99.35	100.72	97.01	100.09	101.03	96.32	99.94	102.49	96.89
2	99.59	100.39	96.94	99.67	102.93	95.42	99.14	99.58	96.63
3	100.22	101.84	97.58	100.33	102.96	96.55	100.05	101.66	95.17
4	97.17	100.03	96.15	99.29	102.89	96.53	99.27	102.29	94.85
5	99.77	101.25	97.61	100.36	103.73	97.16	100.42	103.68	95.22
6	98.83	99.44	97.24	100.18	102.96	99.62	100.16	103.05	98.99
X	99.16	100.61	97.09	99.99	102.75	96.93	99.83	102.12	96.29
D.E.	1.08	0.86	0.54	0.42	0.90	1.43	0.51	1.42	1.56
D.E.R.	1.09%	0.85 %	0.55 %	0.42 %	0.88 %	1.48 %	0.51 %	1.39 %	1.62 %

4. CONCLUSIONES.

El método de análisis por CLAR desarrollado para cuantificar alcohol bencílico, metilparabeno y propilparabeno en una suspensión inyectable de acetato de prednisolona demostró ser preciso y exacto.

Adicionalmente este método permite llevar a cabo la determinación de los tres conservadores simultáneamente y en presencia de los contami nantes más comunes del alcohol bencílico y del acetato de prednisolo na con un tiempo de análisis aproximado de 30 minutos.

Esta técnica puede emplearse para el control de calidad de este producto con un ahorro considerable de tiempo en comparación a los méto dos analíticos reportados hasta la fecha.

BIBLIOGRAFIA.

1. A. Rego and B. Nelson, J. Pharm. Sci., 77, 1219, (1982).
2. C.J. Lindermann and A. Rosalia, J. Pharm. Sci., 58, 118. (1969).
3. Connors, Kenneth and Cori on L.A.
Chemical Stability of Pharmaceuticals .
John Wiley and Sons. N.Y. 1979. pp. 260-26 .
4. Connors, Kenneth.
A Textbook of Pharmaceutical Analysis.
Interscience Publication. 2nd. ed. USA 1975. pp. 260-26 ,307-310.
5. Dabrio Bañuls, M.V.
Cromatografía de gases I.
Ed. Alhambra. Esp., 1979. pag. 6-16.
6. F.A. Fitzpatrick et al., J.Soc. Cosmet. Chem., 26. 377, (197).
- 7 ; Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.
4a. ed. México, 1974. pag. 971, 1072.
8. Fritz James S.
Química Analítica Cuantitativa.
Ed. Limusa. Méx. 3a. ed. pág. 427 -484

9. Groves, M.J.
Parenteral Products.
Ed. Willidm Heinemann. Medical books limited!
England. 1973, pp. 4-10; 307-310.
10. H.C. Van Dame., JAOAC., 63, 1184, (1980).
11. Higuchi Takeru and Einar Brochman-Hanssen.
Pharmaceutical Analysis.
Ed. Interscience Publishers. N.Y. 1961. pp. 18-20.
12. J.K. Taylor., Analytical Chemistry., 55, 600, (1983).
13. J.L. Lach and J.S. Sawardeker., J.Pharm. Sci., 54, 424, (1965).
14. King et al. JAOAC 63, 137, (1980).
15. Kiyoshi Tsuji.
GLC & HPLC Determination of Therapeutic Agents.
Marcel Dekker. Inc. N.Y. 1978. pp. 1-44.
16. Lachman, Leon.
The Theory and Practice of Industrial Pharmacy.
2nd. ed. USA 1976, Lea & Febiger. pp. 162-183; 586-625, 552t.

17. Martin, Alfred.
Physical Pharmacy.
2nd. ed. Lea & Febiger. London 1969. pp. 516-528.
18. Martindale The Extra Pharmacopoeia.
27th. ed. The Pharmaceutical Press. London. pp. 1272-1273.
19. M. Batchelder et al. J. Pharm. Sci., 61, 252 (1972).
20. P. Daenens and L. Laruelle., JAOAC., 56, 1515, (1973).
21. Remington's Pharmaceutical Sciences.
15th. ed. USA 175. Mack Publishing Company, pp. 1411-1419.
22. S.J. Donato., J. Pharma. Sci., 54, 917, (1965).
23. Snyder L.R. & J.J. Kirkland.
Introduction to Modern Liquid Chromatography.
2nd. ed. John Wiley & Sons. Inc. N.Y. 1979. pp. 126-153.
24. The Merck Index.
9th. ed. Merck & CO. Inc. US 1976.
25. T.P. Radus Thomas and Gyr Gretchen., J. Pharm Sic., 72, 221 (1983).
26. The United States Pharmacopoeia.
20th. red. United States Pharmacopoeia Convention Inc. USA 1980. pp. 91.
27. Von Seija Tommlehto and J. Buchi, Pharmaceutica Acta Helvetiae, 44, 290,(1969).
28. Waters Associates.
Operator's manual. USA 1982. Waters Associates.

29. Yost. R.W

Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica.

1a. ed. Perkin Elmer. USA 1980. pág. 5, 18 - 23, 227-229.