

S701:7



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA

1
2ej

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos por Clar
para la Determinación Cuantitativa de Clorhidrato de
Fenilefrina, Maleato de Clorfeniramina y Acetaminofenol
Contenidos en Diferentes Formas Farmacéuticas**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA ANGELICA SOLEDAD MORALES PALLARES



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

	Pág.
1.- INTRODUCCION	1
2.- GENERALIDADES	3
A.- Cromatografía	3
B.- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	6
C.- Monografías	24
D.- Validación de Métodos Analíticos	39
3.- PARTE EXPERIMENTAL	44
A.- Determinación cuantitativa de -- Clorhidrato de Fenilefrina y Ma- leato de Clorfeniramina por CLAR en gotas y jarabe	45
B.- Determinación cuantitativa de Acetaminofenol por CLAR en gotas y jarabe.	52
4.- RESULTADOS	59
A.- Especificidad	59
B.- Linearidad	78
C.- Exactitud y Precisión del método	86
D.- Reproducibilidad	89
5.- CONCLUSIONES	94
6.- BIBLIOGRAFIA	96

1.- INTRODUCCION

La inclusión en la terapéutica de medicamentos con formulaciones complejas, hace necesario el uso de técnicas analíticas confiables y reproducibles, que nos permitan asegurar la integridad de los principios activos contenidos en los productos farmacéuticos y monitorear la estabilidad de los mismos.

Un problema siempre presente en el campo del análisis farmacéutico es el efectuar determinaciones cualitativas y cuantitativas, exactas y confiables, y lograr la separación adecuada de cualquier interferencia debida a las sustancias auxiliares utilizadas en la fabricación de los medicamentos y/o a productos de descomposición de los principios activos o de los provenientes de las sustancias auxiliares.

La tecnología analítica moderna, nos ofrece una serie de técnicas analíticas de gran aplicación y alta confiabilidad, como una valiosa herramienta para resolver una gran parte de los problemas analíticos que día a día se presentan en los laboratorios de control de calidad y en los de investigación y desarrollo de la Industria Químico Farmacéutica.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es considerada en la actualidad como la técnica de elección para separar, identificar y cuantificar fármacos, sus metabolitos y/o los productos de descomposición formados durante el almacenamiento de los productos o en el transcur-

so de los estudios de estabilidad de los mismos.

El desarrollo de un método analítico requiere no sólo del conocimiento de las propiedades físico-químicas de cada uno de los componentes de una formulación, sino también de la adecuada aplicación de la instrumentación analítica, elegida y de la correcta interpretación de los valores de los parámetros obtenidos en la validación del método, ya que ellos nos indicarán si éste es lineal, exacto, preciso, reproducible y específico.

El presente trabajo muestra la aplicación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar: Clorhidrato de Fenilefrina (Clorhidrato de (R)-3-hidroxi- α -[(metilamino) metil] benzenometanol), Maleato de Clorfeniramina (Maleato de 1-(4-clorofenil)-3-dimetilamino-1-(2-piridil) propano), Acetaminofenol (N-(4-hidroxifenil) -acetamida), contenidos en 2 diferentes formas farmacéuticas.

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en la validación de los métodos desarrollados, se llevó a cabo utilizando los parámetros estadísticos: media (\bar{x}), desviación estandar (DE), coeficiente de variación (CV), coeficiente de correlación (r), error estandar de regresión (S_y/X) límites de confianza ($L_{95\%}$), pendiente (m) e intercepto (b).

2.- GENERALIDADES

A.- CROMATOGRAFIA. (1,3,11)

La Cromatografía antes de ser denominada como tal; por el botánico ruso Michael Tsweet, ya era practicada en forma empírica, por los griegos y egipcios. Con el paso del tiempo, se despertó el interés por éste método de separación permitiendo conocer las bases teóricas de los principios -- que rigen éste tipo de separaciones; así, gracias a la -- aportación de varios investigadores, la cromatografía fué -- evolucionando encontrándose diferentes técnicas analíticas - cromatográficas como por ejemplo: cromatografía en capa delgada, cromatografía de exclusión, cromatografía de gases, -- cromatografía de líquidos, termocromatografía etc...

Los procesos cromatográficos pueden ser aplicados -- tanto para la purificación y separación de mezclas de sustancias, como para el aislamiento y determinación cuantitativa de los componentes individuales.

La efectividad y sencillez de esta técnica, aunada a la alta reproducibilidad y la gran variedad de formas posibles en que puede efectuarse una separación cromatográfica, son la base de la versatilidad que se le ha conferido.

Todo sistema cromatográfico, está integrado por tres componentes primordiales:

- a).- Fase estacionaria o fija (solvente, soporte --- etc.)
- b).- Fase móvil (eluyente)

c).- Compuesto o mezcla de compuestos a separar.

La separación de los componentes de la mezcla, se -- lleva a cabo por la distribución de ésta a través de la fase estacionaria y la fase móvil.

Dependiendo de la interacción de los componentes - con la fase estacionaria y/o la fase móvil, de su estado ffísico (sólido, líquido o gaseoso) y en general de sus propiedades fisicoquímicas, (grado de polaridad, punto de ebullición, grado de ionización, carga eléctrica, etc.) resultará cualquiera de los principios fisicoquímicos que rigen el método de separación cromatográfica. Así pues, considerando - el tipo de interacción entre los tres componentes del sistema es posible establecer los siguientes tipos de cromatografía:

A.- Cromatografía de Adsorción.

Se basa en las diferencias de polaridad entre -- las moléculas de la mezcla y la afinidad de éstas por la fase estacionaria.

El adsorbente (fase estacionaria), posee un alto poder de atracción electrostática sobre la mezcla de compuestos; la separación puede efectuarse mediante fuerzas competitivas entre la fase - móvil empleada y la fase estacionaria. Los componentes de la mezcla tienden a adsorberse al sólido (fase estacionaria), con diferente grado de intensidad de acuerdo a su polaridad, tipo y - número de grupos funcionales, longitud de cadena, etc.

Por lo tanto, los compuestos de mayor polaridad - se adsorben más fuertemente y migran a través -- del sistema más lentamente que los compuestos no

polares o de menor polaridad.

B.- Cromatografía de Partición.

El mecanismo de separación, se basa en la diferencia de solubilidades de los compuestos a separar entre dos fases no miscibles entre sí, la fase estacionaria y la fase móvil, que en éste caso son líquidas. La función del adsorbente, en este tipo de cromatografía, es servir exclusivamente, como soporte inerte para la fase estacionaria.

Puesto que los sitios capaces de ejercer una atracción electrostática sobre la mezcla, están ocupados por un líquido, la separación se lleva a cabo por la distribución de los componentes entre las dos fases líquidas. A éste proceso se le llama "Distribución" ó "Partición".

C.- Cromatografía de Intercambio Iónico.

En éste tipo de cromatografía, la separación de los componentes se hace de acuerdo a la carga de las moléculas y a la presencia de grupos reactivos ionizables existentes tanto en los compuestos a separar como en el soporte o fase estacionaria.

D.- Cromatografía de Exclusión.

Este tipo de cromatografía se basa en la separación que puede realizarse en una mezcla de compuestos de acuerdo a las diferencias de pesos moleculares de los mismos al penetrar a través de una capa de geles porosos.

En cuanto a la metodología que se ha desarrollado pa

ra llevar a cabo cualesquiera de éstos tipos de cromatografía pueden presentarse una serie de variaciones según sea la combinación de los distintos tipos de fase móvil y fase estacionaria. (cuadro No. 1)

Con esto puede concluirse, que si la fase estacionaria está extendida sobre una superficie o placa, contenida en una columna, si se le aplica al sistema presiones elevadas, o si se utiliza un gas o un líquido como fase móvil para efectuar la separación, ello representa características metodológicas de la técnica cromatográfica, pero el principio fisicoquímico de la separación será adsorción, partición o cualquiera de los indicados anteriormente.

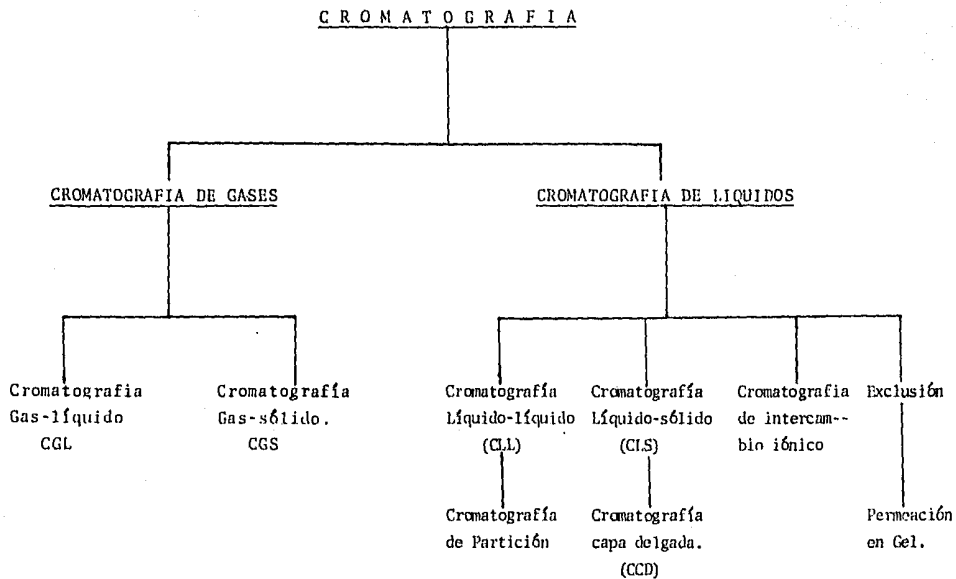
B. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR) (1,2,3,4).

Hasta 1968 se produjo un avance considerable en técnicas sobre cromatografía líquida; éste avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua y automatizados.

Existen modificaciones entre los aparatos usados en CLAR, dependiendo del fabricante; pero básicamente un cromatógrafo de líquidos consta de las siguientes partes:

(Figura No. 1)

- a).- Depósito de solventes
- b).- Bomba
- c).- Cámara de inyección
- d).- Columna
- e).- Detector
- f).- Registrador o integrador



Cuadro No. 1: Tipos de Cromatografía según sea la combinación de los distintos tipos de fase móvil y fase estacionaria.

+g).- Sistema para gradiente

+h).- Termostato.

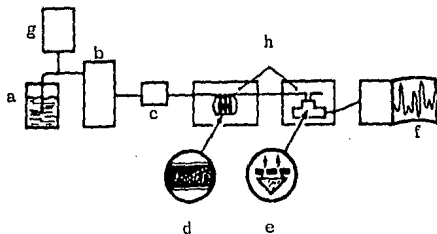


Fig. 1. Cromatógrafo de líquidos

+ Estos aparatos forman parte de cromatógrafos más sofisticados.

Depósito de Solventes

Estos pueden ser de vidrio; algunos vienen incluidos en el aparato o también pueden utilizarse matraces de vidrio.

Bombas

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas:

- a).- Bombas mecánicas
- b).- Bombas neumáticas

Las bombas mecánicas pueden ser recíprocas (pistón o

diafragma) y de desplazamiento continuo.

Para trabajar con CLAR, se requiere de un sistema de bombeo que proporcione altas presiones para que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable ya que el material de relleno de la columna, constituido por partículas muy pequeñas hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea elevada.

Los aspectos más importantes en cuanto al sistema de bombeo son:

- 1).- Presión máxima de operación
- 2).- Intervalo de volúmenes obtenibles
- 3).- Reproducibilidad y constancia del flujo
- 4).- Características del flujo.

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fase móvil y la limpieza del sistema.

Inyector

La principal consideración a tener en cuenta en el diseño de un inyector es la necesidad de proporcionar una zona de poco volumen completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra y la dilución exponencial; además debe resistir altas presiones. En ésta cámara es donde se introduce la muestra que luego es arrastrada por la fase móvil a la columna.

La muestra se puede introducir por medio de jeringas especiales, válvulas de inyección, inyectoros automáticos o

por interrupción del flujo, dependiendo de la presión a que se trabaje y el tipo de bomba que se utilice.

Detector

El detector, colocado a la salida de la columna, -- proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale de la columna.

Un detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos:

- 1).- Altamente sensible
- 2).- Estable
- 3).- De lectura continua
- 4).- De respuesta universal.

Hoy en día no existe un detector ideal y los que hay disponibles sólo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular.

La función del detector cromatográfico es medir en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene generando una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que ésta sale de la columna.

Existen varios tipos de detectores, siendo los de -- uso más generalizado:

- a).- Detector de Índice de Refracción.

Este es el detector de uso corriente más universal.

Un índice de refracción determinado es una característica física definida de todos los compuestos. Sin embargo, aparecen ocasionalmente algunos problemas al efectuar la elección de un sistema de fase móvil que sea compatible con el tipo de separación y con los componentes del instrumento, pero cuyo índice de refracción sea diferente del de la muestra. Puesto que la detección se basa en equilibrar el sistema a caudal constante de fase móvil pura y medir el cambio de índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil, resulta obvio que cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil, mayor será el desequilibrio. Por tanto, la máxima sensibilidad se obtendrá cuando exista la máxima diferencia entre la muestra y la fase móvil. Por otra parte, en mezclas complejas los índices de refracción de los componentes de la mezcla pueden cubrir un amplio intervalo de valores y algunos de ellos pueden ser muy cercanos al de la fase móvil, resultando invisibles para el detector. Otro inconveniente es la necesidad de reequilibrar el detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la composición de la fase móvil. Este factor resulta muy limitativo, pues inutiliza al detector de índice de refracción en el trabajo con elución por gradiente en el que la composición de la fase móvil se cambia durante el análisis para efectuar la separación. Es posible intentar la preparación de mezclas de disolventes de alta y baja polaridad mezclados cuidadosamente para tener iguales índices de refracción pero resulta sumamente difícil a menos que se trabaje a baja sensibilidad.

En la actualidad se suele utilizar dos tipos básicos de detectores de índice de refracción. Ambos requieren el uso de una cubeta de doble paso, en la que el lado que contiene la muestra se compara constantemente con el lado de referencia, que no contiene muestra.

b).- Detector de UV

El detector de más uso es el detector UV, su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta por lo cual la respuesta del detector es selectiva, ya que sólo detectará compuestos que absorban luz de longitud de onda a la que opera el detector. Este detector es relativamente insensible a los cambios de flujo y de temperatura, siempre y cuando el disolvente no absorba en grado - - apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro; es fácil efectuar programaciones de la fase móvil y es posible que pueda detectar cantidades de muestra del orden de 2 ng. - si el compuesto absorbe intensamente en UV.

Opera a una longitud de onda de 254 nm. o 280 nm. -- utilizando como fuente de luz ultravioleta una lámpara de -- mercurio de baja presión; aún para compuestos que presentan su máximo de absorción a una longitud distinta de 254 nm. o 280 nm. la sensibilidad es buena,

c).- Detector de Fluorescencia.

Los detectores de fluorescencia representan el tercer tipo de detectores más comunmente utilizados en la moderna CLAR. Para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por simple derivatización, es el tipo de detección -- más sensible que existe. Normalmente la sensibilidad de la fluorescencia es 1,000 veces mayor que la del detector UV para compuestos con absorción UV intensa, y la sensibilidad -- del detector UV es, naturalmente, 1,000 veces mayor que la -- del detector de índice de refracción. Al aumentar la sensibilidad también aumenta la especificidad. Los detectores de

fluorescencia son los más sensibles y específicos de todos - los detectores ópticos, lo cual se usa ventajosamente en la determinación de especies con fluorescencia específica en -- muestras complejas. De hecho, una de las mayores ventajas - potenciales de la detección por fluorescencia, en espe- cial si se usa instrumentación que permita efectuar tantos - barridos de excitación como de emisión, reside en la posibi- lidad de proporcionar datos para la identificación de los pi- cos a través de sus espectros de excitación y de emisión uti- lizando técnicas de registro con paro de flujo. Los espec- tros de excitación y de emisión de una sustancia proporcio- nan una gran cantidad de información. Incluso con instru- mentación más sofisticada, que permita obtener, los espec- tros corregidos, se puede lograr la interpretación estructu- ral de los espectros de fluorescencia mediante computador, - lo cual ayuda la identificación de los compuestos.

La fluorescencia tiene lugar cuando los compuestos - que poseen determinados grupos funcionales específicos se -- excitan con energía de ciertas longitudes de onda (cortas) y emiten radiación de mayores longitudes de onda. Normalmen- te la emisión se determina en dirección perpendicular a la - excitación, y naturalmente la capacidad real de fluorescen- cia de grupos químicos específicos es función de las longitu- des de onda de la excitación y de la emisión.

d).- Detectores de longitud de onda variable.

Los detectores de longitud de onda variable son par- ticularmente útiles en tres casos:

En el caso de que pueda obtenerse una mejor sensibi- lidad a una longitud de onda distinta de 254 nm. o de otras-

longitudes de onda para las que existen filtros.

En el caso de que los distintos componentes de la muestra presenten gran absorción a diferentes longitudes de onda, y, por tanto, el trabajo a una única longitud de onda reduzca la sensibilidad e incluso pueda resultar imposible la detección de algunos de los componentes de la muestra.

Los modernos detectores de UV son capaces de trabajar a cualquier longitud de onda entre 190 y 600 nm. En algunos detectores el cambio de longitud de onda se efectúa manualmente, mientras que en otros puede programarse en función del tiempo por medio de la memoria del instrumento, lo cual permite operar sin atención por parte del personal. Los aparatos más sofisticados también, permiten un registro automático de todo el espectro, parando automáticamente el flujo cuando la cubeta contiene una determinada fracción del efluente de la columna.

Como ya se ha mencionado, una característica especial de algunos detectores de UV de longitud de onda variable es la posibilidad de efectuar registros de espectros y lecturas exactas de absorbancias a muchas longitudes de onda mientras la muestra correspondiente a un pico permanece en reposo en la cubeta. La espectroscopía con paro de flujo añade una nueva dimensión a la capacidad analítica de la cromatografía líquida, ya que permite obtener una información cualitativa que supera la simple identificación por tiempos de retención.

Existen dos aplicaciones principales de la cromatografía con paro del flujo. En la primera, se pueden evaluar cuáles son las mejores longitudes de onda para un determinado análisis, lo cual resulta de particular interés cuando no

se posee información acerca de las absorptividades molares a distintas longitudes de onda. La segunda aplicación importante se refiere a la pureza de los picos. Muchas veces la forma de un pico no revela por sí sola si corresponde en realidad a uno, dos o incluso más componentes. En estos casos la relación de absorbancias a varias longitudes de onda es particularmente útil para decidir si un pico representa a un único compuesto o si en realidad es un pico compuesto.

Registrador.

La función de los registradores es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector.

Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 a 10 mv. Otras características deseables de los registradores son respuesta rápida de la pluma (sensibilidad) y velocidad variable del papel.

Sistema para Gradiente (elución por gradiente)

En Cromatografía líquida podemos usar una única sustancia como fase móvil durante el análisis de una mezcla de dos o más sustancias, ajustando adecuadamente las características de la fase. También es posible mantener constante la composición de la fase móvil durante el análisis o bien cambiarla. El primer método se llama operación isocrática, - - mientras que el segundo se conoce como elución por gradiente.

La elución por gradiente se utiliza con muestras cuyos componentes posean polaridades muy diferentes, pues en -

estos casos es preferible variar la polaridad de la fase móvil durante el análisis con el fin de mejorar la separación de los componentes que se eluyen en último lugar. En general, pero no necesariamente, se empieza con una sustancia única y se aumenta con el tiempo la concentración del otro componente (o componentes) de la fase móvil. La variación puede ser lineal, o bien puede seguir diferentes formas no lineales. La figura 2. ilustra las posibilidades de varios tipos de elución por gradiente, mientras que la figura 3. representa el esquema funcional del sistema que efectúa las mezclas y suministra la fase móvil a la columna.

Columnas.

En todo sistema cromatográfico, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales, el acero inoxidable es el más usado.

Para que la separación de los componentes de la mezcla sea satisfactoria dentro de la columna, es necesario considerar algunos parámetros tales como:

1.- Resolución.

La resolución entre dos picos está dada por la siguiente ecuación:

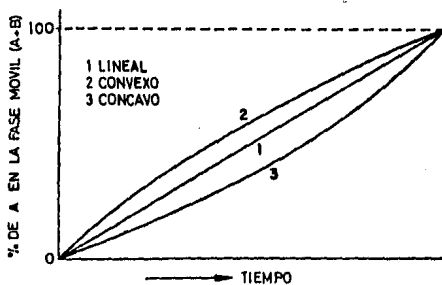


Fig. 2 Las tres posibilidades de variación de la composición de la fase móvil en la elución por gradiente.

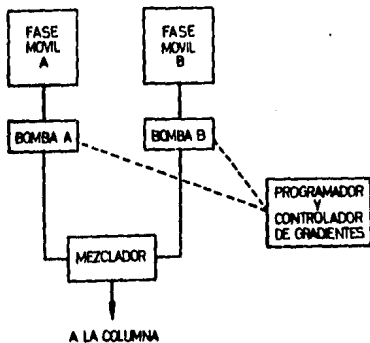


Fig. 3 Esquema funcional de un equipo para la elución por gradiente.

$$R = \frac{Tr_2 - Tr_1}{\frac{w_2 + w_1}{2}} = \frac{2\Delta T}{w_2 + w_1}$$

Tr_1 y Tr_2 , tiempos de retención de los componentes - medidos desde la inyección hasta el pico máximo; w_2 y w_1 , amplitud de la base de los picos medida en unidades de tiempo.

Tiempo de retención: es el tiempo que tarda en -- eluir la muestra desde el momento en que se introduce la -- muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico -- en la gráfica trazada por el registrador.

2.- Eficiencia.

La eficiencia de la columna determinada la amplitud del pico y está en función de parámetros de la columna tales como velocidad de flujo, tamaño de partícula, diámetro.

La eficiencia de la columna es expresada cuantitativamente por el número de platos teóricos:

$$N = \left(\frac{Tr}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{Tr}{W}\right)^2$$

donde σ es la desviación estandar del pico.

$$W = 4\sigma$$

El concepto de platos teóricos está basado en la teoría de destilación y es una forma ambigua como está relacionado con el proceso cromatográfico. Básicamente la fórmula compara la amplitud del pico W a lo largo del tiempo de retención del compuesto que ha estado en la columna.

3.- Selectividad

La selectividad de la columna es medida por la separación relativa de los picos; está dada por:

$$\alpha = \frac{Tr_2 - T_m}{Tr_1 - T_m} = \frac{T'r_2 K_2}{T'r_1 K_1}$$

donde Tr_1 y Tr_2 son los tiempos de retención de los componentes 1 y 2 respectivamente.

K_1 y K_2 son los coeficientes de distribución de los componentes 1 y 2 respectivamente.

T_m es el tiempo de retención del solvente.

4.- Capacidad de la columna.

La capacidad de la columna K' es la forma de indicar la retención del soluto. K' está dada por la ecuación:

$$K' = \frac{Tr - T_m}{T_m}$$

donde Tr es el tiempo de retención del pico dado y T_m es el tiempo de retención del solvente.

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno.

Las columnas más utilizadas en cromatografía líquida tienen una longitud de 10cm - 50 cm y están rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5 μ m - 10 μ). El diámetro interno de las columnas generalmente es de 2 a 8 mm, considerando como el óptimo compromiso entre capacidad de muestra,-

consumo de fase móvil, velocidad de flujo y resolución. También se ha encontrado que se obtiene la mayor eficacia cuando las paredes de la columna están muy lisas y pulidas.

La columna puede usarse a temperatura ambiente o a -- temperatura superior. Aunque la temperatura puede utilizarse, al igual que en cromatografía de gas, para el control del proceso de separación, no es ésta la principal razón para el uso de temperaturas elevadas. En la cromatografía líquida se utiliza por cuatro razones principales:

- Para disminuir la viscosidad de la fase móvil y lograr así presiones menores y aumento de la transferencia de masa;
- Para aumentar la solubilidad de la muestra en la fase enlazada y obtener así una mayor eficacia global del equipo;
- Para aumentar la velocidad de migración iónica en los sistemas de intercambio iónico, con lo que se obtiene una mayor frecuencia de intercambio por -- unidad de longitud de la columna, y por tanto un mayor intercambio; y
- Para aumentar la solubilidad de la muestra en la fase móvil, cuando es muy baja, lo que permite la introducción de una cantidad de muestra adecuada.

En general, para alcanzar estos objetivos son suficientes temperaturas de 50 - 70°C.

Sin embargo, independientemente del hecho de que se necesiten o no temperaturas elevadas, en muchos casos es con-

veniente el control de temperatura debido a que en algunas columnas la eficacia puede variar con muy pequeños cambios de temperatura ambiente, del orden de 2 - 4°C.

Al igual que cualquier proceso cromatográfico la separación en cromatografía líquida se lleva a cabo mediante la interacción entre la muestra y la fase estacionaria; por lo tanto la apropiada selección de ésta última representa una decisión clave en cromatografía líquida.

Los rellenos más ampliamente utilizados hoy día en la cromatografía líquida de partición tienen fase estacionaria químicamente enlazada a las partículas del soporte, son las fases enlazadas, que poseen larga duración y no requieren acondicionamiento o preactivación de la fase móvil, como ocurría en años anteriores.

Las fases enlazadas se preparan por reacción química entre los grupos hidroxilos de la superficie de las partículas de sílice y una molécula orgánica lineal o un organosilano.

Aunque también existen fases enlazadas polares que se utilizan en fase normal, por ejemplo las que contienen un grupo amino (NH_2), ciano (CN^-) al final de la cadena hidrocarbonada; las más ampliamente utilizadas son de naturaleza no polar, con una cadena alquílica por ejemplo octadecilo enlazada por medio del átomo de silicio del alquilsilano. Estas fases se utilizan en fase inversa (en la que la fase móvil es más polar que la fase estacionaria) y son útiles en la separación de una amplia variedad de sustancias.

En la preparación de las fases enlazadas, se utilizan partículas totalmente porosas; éstas son generalmente de gel-

de sílice, de gran superficie, y se dispone de ellas en gran variedad de tamaños de partícula.

El tamaño de partícula es muy importante, ya que la fase móvil y la muestra disuelta no se difunden con facilidad con lo cual las partículas de relleno han de ser tan pequeñas como sea posible en la práctica con el fin de aproximarse a la condición ideal, en la que la muestra se pone en contacto con la máxima cantidad de superficie de relleno. Existe sin embargo un límite inferior de tipo práctico, aproximadamente por debajo de unos $3\mu\text{m}$ de diámetro las partículas empiezan a empaquetarse de manera tan compacta que el líquido no puede bombearse con facilidad a lo largo de la columna. La mayoría de las columnas comerciales hoy en día contienen rellenos con partículas cuyo tamaño promedio es de $5\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$

En cromatografía líquida, la fase móvil desempeña una parte activa, por tanto, la adecuada selección de la fase móvil es una de las decisiones más importantes al establecer los parámetros de una separación en cromatografía líquida.

La selección de los líquidos usados como fase móvil depende de varios parámetros. En las cromatografías de adsorción y partición, el papel más importante lo desempeña la polaridad, pero también son importantes otras características para que la fase móvil sea útil en cromatografía líquida:

- 1).- Esta no debe degradar o disolver la fase estacionaria.
- 2).- Debe ser compatible con el detector
- 3).- Debe disolver la muestra.
- 4).- Debe tener baja viscosidad.
- 5).- Debe permitir un fácil rescate de la muestra si se desea.

- 6).- Debe ser pura.
- 7).- Debe ser comercialmente disponible y ser de precio razonable.

Los líquidos normalmente utilizados son: hexano, iso-octano, cloruro de butilo, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetónitrilo, iso-n-propanol, metanol y agua. De todos ellos, los subrayados pueden obtenerse con gran pureza que da lugar a transparencia en UV hasta longitudes de onda muy bajas.

Mediante mezclas de los disolventes mencionados pueden obtenerse fases móviles de un amplio rango de fuerzas iónicas.

Cuando la fase móvil contiene una cantidad excesiva de gas disuelto a la presión producida por la columna, el gas puede desprenderse de la solución a la salida de la columna o en el detector, dando lugar a súbitas "puntas" o a deriva en la línea base. Estas súbitas puntas son debidas a las burbujas microscópicas que cambian la naturaleza de la corriente líquida, haciéndola heterogénea, mientras que la deriva ocurre a medida que éstas microscópicas burbujas se agrupan gradualmente y llegan a la cubeta del detector, donde se combinan, ya que normalmente es la zona del aparato con menor presión. En circunstancias normales, los líquidos que se suministran y almacenan en depósitos cerrados no llevan gran cantidad de gas y pueden utilizarse sin degasificarlos. Los líquidos más polares, tales como alcoholes y agua, tienen tendencia a mantener cantidades de gas inaceptables. Una regla general es intentar utilizar el líquido sin degasificar, en especial si la cantidad de muestra permite trabajar a una sensibilidad de 0.10 unidades de absorbancia o mayor, o a una sensibilidad de índice de refracción $\times 4$, o mayor, expresado -

en las unidades utilizadas normalmente. Si tiene lugar un desprendimiento de gas, se observarán series (en general muy regulares) de picos agudos en el registrador. Si se utiliza un detector de fluorescencia, es importante degasificar, ya que el oxígeno disuelto puede suprimir la fluorescencia, reduciéndose en gran medida la sensibilidad o introduciendo ruido de fondo excesivo en la línea de base.

Cuando se precise degasificar puede seguirse alguno de los siguientes métodos, o bien alguna combinación entre ellos:

Calentar el líquido hasta ebullición.

Conectar el líquido a una fuente de vacío.

Colocar el recipiente del líquido en un baño de ultrasonido, o introducir en él una sonda ultrasónica.

Hacer burbujear una suave corriente de helio a través del líquido. El helio tiene la propiedad exclusiva de desplazar otros gases de la solución.

C.- MONOGRAFIAS

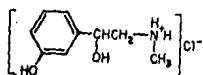
1.- CLORHIDRATO DE FENILEFRINA (5,6,7,8,9,10).

Nombres Químicos y Sinónimos.

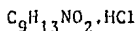
Clorhidrato de (R)-3-hidroxi- α -[(metilamino)metil] benzenometanol; Clorhidrato de 1-m-hidroxi- α -[(metilamino)metil] benzil alcohol; Clorhidrato de 1-I-(m-hidroxifenil)-2-metilamino etanol; Clorhidrato de 1- α -hidroxi-B-metilamino-3-hidroxi-I-etilbenceno; Clorhidrato de m-metilaminoetanol-fe-

nol; metaoxedrin; Adrianol; Clorhidrato de isofrin; Lexatol;-
Clorhidrato de metasinefrina; Meta simpatol; Mezaton; Neofrin
Clorhidrato de neo-sinefrina; Oftalfrina.

Fórmula Desarrollada



Fórmula Condensada



Peso Molecular

203.67

Descripción

Cristales blancos o casi blancos; incoloros; con sa-
bor amargo

Solubilidad

Libremente soluble en agua y en alcohol.

Punto de Fusión

140°C - 145°C

Rotación Óptica

25

D= -42° a - 47.2° (solución: 500mg/10 ml).

Ensayos de Identidad.

- 1.- El espectro I.R. de una dispersión en bromuro de potasio exhibe una absorción máxima a la misma-longitud de onda que una preparación similar de - clorhidrato de fenilefrina, U.S.P, sustancia de referencia.
- 2.- Disolver 300 mg en 3 ml de agua en un tubo de - ensayo; adicionar 1 ml de amonía T,S y raspar el interior del tubo con un agitador de vidrio. Fil|trar la fenilefrina separada, lavar con unas go-tas de agua fría y secar sobre sílica gel por 16- horas: la fenilefrina base obtenida funde entre 170° - 177°C.
| |
- 3.- Una solución (1:100) responde a la prueba de clo- ruros: añadir nitrato de plata T.S, se produce un precipitado blanco, el cual es insoluble en áci- do nítrico pero es soluble en un exceso de amo- nía T.S. La solución 1:100 se acidula con ácido- nítrico.

Pérdida por secado.

Pesar 1 gr. de sustancia y secar a 105° durante 2 ho- ras; después de éste tiempo no debe perder más del 1% de su - peso.

Residuo de Ignición.

No más de 0.2%. Pesar 1 gr. de sustancia, humedecer- la con ácido sulfúrico R,A y calcinar a 500°C; cuando dejen -

de salir vapores blancos, meter a la mufla a temperatura de $800 \pm 25^{\circ}\text{C}$.

El crisol debe estar previamente tarado.

Sulfatos

0.25 gr. deben cumplir con el límite para la prueba - de sulfatos: se disuelve la sustancia en agua y se transfiere a un tubo Nessler, adicionar 2 ml de ácido clorhídrico. -- Diluir a 45 ml con agua y adicionar 5 ml de sulfato de bario R.A., agitar y esperar 5 min. La turbidez producida no debe ser mayor que la de la referencia preparada de la siguiente - manera: poner 1.25 ml de ácido sulfúrico 0.001 N y 2 ml. de ácido clorhídrico en un tubo Nessler, diluir a 45 ml. con - - agua y adicionar 5 ml. de sulfato de bario R.A. agitar y esperar 5 min. para después comparar.

Cetonas

El coeficiente de extinción de una solución 0.2% w/v - en celda de 1 cm. a 310 nm, es no más de 0.200.

Contenido de Cloruros

Disolver aproximadamente 300 mg en 5 ml de agua, adicionar 5 ml. de ácido acético glacial y 50 ml de metanol, después adicionar eosina T.S., titular con nitrato de plata 0.1-N. Cada ml. de nitrato de plata 0.1 N equivale a 3.545 mg. - de cloro. No debe contener menos del 17% y no más del 17.7% - de cloro calculado en base seca.

Valoración

Titulación residual con tiosulfato de sodio 0.1 N. -- Pesar exactamente alrededor de 100mg de clorhidrato de fenilefrina, transferir a un matraz yodométrico, disolver con 20 ml de agua, adicionar 50.0 ml de bromuro 0.1 N, después adicionar 5 ml de ácido clorhídrico y taparlo inmediatamente. Mezclar y dejar reposar 15 min. Introducir inmediatamente 10 ml de yoduro de potasio (1:10), esperar 5 min, agitar, quitar el tapón, lavarlo al igual que la boca del matraz con una pequeña cantidad de agua. Titular el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0.1 N, adicionar 3 ml. de almidón T.S. cuando esté próximo el punto final. Determinar un blanco. Cada ml. de bromuro 0.1 N equivale a 3.395 mg. de clorhidrato de fenilefrina ($C_9H_{13}NO_2.HCl$).

Titulación anhidra.- Pesar exactamente alrededor de 0.5 gr. de clorhidrato de fenilefrina, transferirlos a un matraz volumétrico de 250 ml. disolver con 50 ml. de ácido acético glacial previamente neutralizado usando ácido perclórico 0.1 N; adicionar 10 ml. de acetato de mercurio 5% (w/v) en ácido acético glacial. Titular con ácido perclórico 0.1 N -- hasta cambio de color correspondiente al máximo valor de $-dE/dV$ en una titulación potenciométrica de la sustancia. La titulación potenciométrica se lleva a cabo usando un electrodo de vidrio.

Absorción por U.V.

En hidróxido de sodio 0.1 N absorbe a 238 nm ($E\%, 1 \text{ cm} = 575$) y a 291 nm ($E\%, 1 \text{ cm} = 192$); en ácido sulfúrico 1 N absorbe a la longitud de onda máxima de 273 nm ($E\%, 1 \text{ cm} = 96$) en ácido sulfúrico a una longitud de 270 nm ($E\%, 1 \text{ cm} = 107$).

Farmacodinamia.

Es un fármaco con acciones adrenérgicas correspondientes a efectos alfa y beta.

Sistema Cardiovascular.- Tiene efectos presores y vasoconstrictores. Provoca una elevación de la presión arterial sistólica y diastólica - amino presora - que debe su acción presora casi exclusivamente a vasoconstricción.

Sistema Respiratorio.- La fenilefrina es un fármaco - broncodilatador, con efectos antagónicos con respecto a fármacos broncodilatadores como la histamina, pero no de gran potencia.

Posee poca acción estimulante sobre el sistema nervioso central.

En el ojo la fenilefrina produce midriasis por efecto adrenérgico alfa.

Actúa directamente sobre las células efectoras uniéndose a los receptores alfa o beta según el caso.

La fenilefrina es estable, no se destruye en el hígado y es activa por vía oral, se absorbe bien por ésta vía y perfectamente por vías parenterales.

No es atacada por la catecol-o-metiltransferasa, por lo tanto es de acción prolongada y se excreta por riñón.

Toxicología.

La intoxicación por fenolaminas en general es con me-

nor frecuencia que con las catecolaminas.

Dosis

Pueden administrarse por vía oral, intramuscular e intravenosa; también se emplea por aplicación local.

Se usan soluciones al 0.25, 0.5 y 1% en gotas nasales y al 0.125% en colirios.

Usos

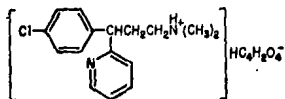
Congestión nasal y como vasoconstrictor en la congestión ocular, en los casos de interacción conjuntival, conjuntivitis alérgica; conjuntivitis folicular.

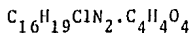
2.- MALEATO DE CLORFENIRAMINA (9,10).

Nombres Químicos y Sinónimos.

Maleato de 1-(4-clorofenil)-3-dimetilamino-1-(2-piridil)-propano; Maleato de Cloroprofenpiridamina; Clorotrimetón (CTM).

Fórmula Desarrollada



Fórmula CondensadaPeso Molecular

390.0

Descripción

Polvo cristalino blanco; inodoro; sabor amargo.

Solubilidad

Soluble a 20°C en 4 partes de agua, en 10 partes de alcohol al 95% y en 10 partes de cloroformo; ligeramente soluble en éter.

Punto de Fusión

132°C - 135°C

Ensayos de Identidad

- 1.- Una solución al 0.002% (w/v) en ácido sulfúrico-0.1 N en celda de 2 cm absorbe en un rango de 230 - 350 nm con un máximo a 265 nm; su coeficiente de extinción a 265 nm es cerca de 0.850.
- 2.- Disolver 0.5 gr en 5 ml de agua; adicionar 2 ml. de solución de amoníaco fuerte y extraer con tres cantidades, cada una de 5 ml de cloroformo.
Evaporar la solución acuosa a sequedad, adicionar

0.2 ml de ácido sulfúrico diluido y 5 ml de agua; extraer con cuatro cantidades cada una de 25 ml. de éter. Combinar los extractos etéreos y evaporar el éter en una corriente de aire caliente. - El punto de fusión del residuo es cerca de 130°C.

Acidez

El pH de una solución al 1.0% (w/v) es de 4.0 a 5.0.

Pérdida por secado

Secada la sustancia a peso constante a 105°C, no debe perder más del 0.5% de su peso.

Cenizas al sulfato

No más de 0.1%

Valoración

Pesar exactamente alrededor de 0.5 gr. de maleato de clorfeniramina, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml. disolver con 20 ml de ácido acético glacial. Adicionar 2 gotas de violeta cristal T.S y titular con ácido perclórico - - 0.1 N. Preparar un blanco para hacer las correcciones necesarias. Cada ml de HClO_4 0.1 N equivale a 19.54 mg. de $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$.

Farmacodinamia

Es un fármaco antihistamínico o antagonista competi

vo de la histamina ya que actúa sobre las células efectoras bloqueando las respuestas de éstas a la histamina.

Los fármacos antihistamínicos son activos para suprimir los fenómenos alérgicos en el hombre, especialmente urticaria, fiebre del heno y dermatitis atípica, siendo poco eficaces en el asma bronqueal.

Se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, vía oral y rectal, y por las vías parenterales; por vía oral la respuesta se observa a los 20 - 30 min y el efecto dura aproximadamente 4 horas.

Se distribuye por todos los órganos y se destruye casi totalmente en el organismo, principalmente en el hígado; y los metabolitos, así como una pequeña porción no transformada, se excretan por orina.

Toxicología

No es un fármaco muy tóxico pero a dosis terapéuticas puede provocar efectos colaterales molestos como reacciones - adversas nerviosas por ejemplo depresión o excitación dependiendo de la dosis, gastrointestinales, cardiovasculares, respiratorias, genitourinarias, cutáneas y hemáticas. Estas reacciones adversas cuando se presentan, ceden al disminuir la dosis.

Cuando se administra éste fármaco antihistamínico no deben ingerirse depresores centrales, tales como el alcohol o los barbitúricos, pues puede haber suma de efectos.

Dosis

Usualmente de 4 mg. tres veces al día, o hasta 16 mg.

en dosis divididas. Por inyección intramuscular de 5 a 20 mg en una dosis.

Usos.

Antihistamínico.

3.- ACETAMINOFENOL (9,10).

Nombres Químicos y Sinónimos

N-(4-hidroxifenil)-acetamida; 4'-hidroxiacetanilida; p-hidroxiacetanilida; p-acetaminofenol; paracetamol; acetaminofen; acetaminofen.

Fórmula Desarrollada



Fórmula Condensada



Peso Molecular

151.16

Descripción.

Polvo cristalino, blanco, inodoro.

Solubilidad

Es soluble a 20°C en 70 partes de agua, en 7 partes de alcohol al 95%, en 13 partes de acetona, en 40 partes de glicerol y en 9 partes de propilenglicol; además es soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos; 50 partes de cloroformo; insoluble en éter.

Punto de Fusión

169° - 172°C

Ensayos de Identidad

- 1.- La absorción por espectro U.V de una solución -- 1:200,000 en 1:100 de solución 0.1 N de ácido clorhídrico en metanol, exhibe máxima y mínima absorción a las mismas longitudes de onda que una solución USP de acetaminofenol, substancia de referencia.
- 2.- A 10 ml. de una solución 1:100 adicionar una gota de cloruro férrico T.S: se produce un color violeta.
- 3.- Disolver 0.2 gr. de acetaminofenol en 4 ml. de piridina, adicionar 0.5 gr. de cloruro de 4 nitrobenzoil, hervir dos o tres minutos, enfriar y poner la solución dentro de 40 ml de agua, agitando continuamente. El punto de fusión del precipitado después de lavar con 30 ml de agua y 30 ml de una solución de 1% w/v de carbonato de sodio, - - 30 ml de agua y recristalización con alcohol al - 95% es de 210°C.

- 4.- Hervir 0.1 gr. de acetaminofenol con 1 ml. de ácido clorhídrico por 3 min, adicionar 10 ml. de agua y enfriar; no se produce precipitado. Adicionar 0.05 ml. de dicromato de potasio 0.1 N; un color violeta aparece paulatinamente, el cual no cambia a rojo (distinción de fenacetina).

Pérdida por secado

1 gr. de muestra secada a peso constante a 105°C no debe perder más del 0.5% de su peso.

Cenizas al sulfato

Máximo 0.1%

Metales pesados

Máximo 10 ppm.

Contenido

Pesar exactamente alrededor de 120 mg. de acetaminofenol, transferir a un matraz volumétrico de 500 ml, disolver con 10 ml. de metanol y llevar al volúmen con agua. Tomar 5.0 ml de ésta solución, transferirlos a un matraz de 100 ml llevar al volúmen con agua y mezclar.

Determinar las absorbancias de la solución y de una solución de referencia preparada de la misma manera, a una concentración alrededor de 12 mcg/ml, en celda de 1 cm, a longitud de onda máxima de 244 nm, usando agua como blanco.

Calcular la cantidad en mg. de $C_8H_9NO_2$ en el acetaminofenol con la fórmula $10C(Au/As)$ en la cual C es la concentración en mcg/ml del estándar respectivamente.

Farmacodinamia

La actividad antipirética del acetaminofenol, reside en la estructura aminobenceno; que con la introducción del radical hidroxilo en el anillo y el grupo libre de la anilina, que es de donde proviene, reduce la toxicidad de ésta -- sin perder la acción antipirética.

El acetaminofenol tiene acciones analgésica y antipirética, similares a la aspirina. Mitiga los dolores moderados, tales como dolor de cabeza, dolores musculares, articulaciones y en nervios periféricos.

Dolores intensos en músculo liso como espasmos en cavidades viscerales no son aliviados.

Reduce la fiebre por acción directa en el centro termorregulador incrementando la disipación del calor del cuerpo.

Absorción, distribución, biotransformación y excreción: primero es metabolizado por las enzimas de los microsomas hepáticos, es rápida y casi completamente absorbido del tracto gastrointestinal.

La concentración máxima en plasma se alcanza en 1/2 hora a 1 hr. La vida media en plasma es de 1 a 3 hr. Es distribuido uniformemente en los fluidos corporales. El fármaco ligado a las proteínas del plasma es variable; 20 a 50% --

del fármaco puede estar ligado a las proteínas a la concentración encontrada durante intoxicación aguda.

Alrededor del 3% del acetaminofenol es excretado intacto en orina, y cerca de 80% es excretado en la orina después de la transformación en el hígado predominantemente con ácido glucurónico y una pequeña porción con ácido sulfúrico.

Interacciones: puede inducir la síntesis de enzimas de los microsomas hepáticos, pero el efecto no se ha observado con dosis usuales; el efecto protrombínico de los agentes anticoagulantes puede ser incrementado por administración crónica de grandes dosis de acetaminofenol; pero dosis intermitentes del fármaco tienen efectos pequeños.

Toxicidad

En dosis terapéuticas recomendadas, el acetaminofenol es tolerado. Reacciones alérgicas como erupciones y otras -- ocurren ocasionalmente.

El efecto más serio causado por dosificación aguda de acetaminofenol es una necrosis hepática; puede ocurrir una necrosis tubular renal y coma hipoglucémico.

El acetaminofenol causa menor formación de metahemoglobina que la fenacetina, pero puede causar trombocitopenia.

Dosis

De 0.5 gr. a 1 gr. 4 gr. diarios en dosis divididas.

Usos

El acetaminofenol es un sustituto adecuado de la aspi

rina para uso analgésico y antipirético en pacientes que son alérgicos a la aspirina, o cuando la aspirina está contraindicada en pacientes con úlcera péptica.

D.- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (12,13,14).

VALIDACION es la determinación del grado de validez de un proceso de medición; ésto quiere decir que la determinación se lleva a cabo después de que el proceso de medición se lleva a cabo.

Un significado alternativo de VALIDACION es "hacer - válido" en el sentido de producir el resultado deseado.

Esta definición indica que el proceso de medición se vaya evaluando en cada paso del desarrollo; así, si existe alguna falla, detectarla antes de concluirlo.

Para realizar la validación de un método analítico, - es necesario contar con el desarrollo previo del método.

Los pasos más usuales para el desarrollo de un método analítico son los siguientes:

- 1.- Consulta bibliográfica, referencias encontradas - en la literatura y otras fuentes de información.
- 2.- Resultados de "Corridas" de prueba.
- 3.- Especificar si se requiere de equipo especial, - condiciones especiales u otros aparatos que sean de disponibilidad comercial, y, por supuesto, las razones de tal especificación.

- 4.- Explicar las posibles fuentes de error y/o imprecisión del método, precisando las medidas necesarias para eliminarlo.
- 5.- Describir el experimento (Metodología), y proporcionar los datos para establecer la precisión, exactitud, especificidad etc... del mismo.
- 6.- Llenar un registro experimental completo del análisis de muestras reales.
- 7.- Realizar comparación de métodos, para contar con métodos alternativos, y/o validaciones inter-laboratorios.

Después de que se ha desarrollado un método analítico se procede a su validación, que depende de las necesidades - de cada laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos gubernamentales y algunas veces del criterio de la persona que la realiza.

Algunos de los puntos que se tendrán que llevar a cabo para poder afirmar que el método que se ha desarrollado es válido son:

I.- LINEARIDAD (Ley de Beer).

Es una medida del grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta, o el grado al cual la sensibilidad es constante (sensibilidad = la pendiente de la curva de calibración analítica expresada como la relación del cambio de señal al cambio de sustancia a analizar)

El método se llamará "lineal" si cumple satisfactoriamente con lo anterior o cuando la desviación de la linealidad no afecte los resultados en la región de análisis usual por más de $\pm 1\%$.

Criterio: $CV \leq 1.5\%$, $r \geq 0.99$, m aprox. =1, b aprox.=0

2.- EXACTITUD (Bias o sesgo).

Es la concordancia entre un determinado valor experimental y el valor aceptado de referencia (ensayo cercado al 100%).

El sesgo de un conjunto de resultados analíticos obtenidos de la misma muestra es el grado de concordancia de la media de los resultados con un nivel de referencia aceptado.

Se determina \bar{X} , DE, CV y el intervalo de confianza - - (L95%).

Criterio: $CV \leq 2\%$.

3.- PRECISION

La precisión de un conjunto de resultados analíticos obtenidos de las muestras, es el grado de concordancia mutua entre los resultados individuales; la precisión es expresada como la desviación estandar (DE) del ensayo, otra expresión con la que se expresa precisión es el coeficiente de variación (CV).

Criterio: $CV \leq 2\%$.

4.- REPRODUCIBILIDAD.

Es la precisión de un método expresado como la concordancia "accesible" entre determinaciones llevadas a cabo por diferentes analistas, en diferentes días, o bien, en diferentes laboratorios, utilizando diferentes equipos.

Criterio: $CV \leq 2\%$

5.- ESPECIFICIDAD (Selectividad).

Es el grado al cual la medición es debida a la sustancia a ser determinada y no a otra y otras sustancias que pueden estar presentes en el material a ser analizado, por lo tanto se dice que un método analítico es selectivo o específico cuando permite al analista determinar el compuesto de interés en presencia de otras sustancias, sin interferencias.

FORMULAS ESTADISTICAS USADAS.

1.- Desviación Estandar (DE)

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

2.- Coeficiente de variación (CV)

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} \times 100$$

3.- Error Estandar (E)

$$E = \frac{DE}{\sqrt{n}}$$

4.- Media (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\Sigma(x)}{n}$$

5.- Coeficiente de Correlación (r)

$$r = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{\sqrt{[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2] [n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2]}}$$

6.- Límites de Confianza (95%)

$$L_{95\%} = \bar{x} \pm t \frac{DE}{\sqrt{n}}$$

7.- Pendiente (m)

$$m = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

8.- Intercepto (b)

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

9.- Error estandar de regresión.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma (y - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

$$\hat{y} = mx + b$$

3.- PARTE EXPERIMENTAL

Las formulaciones sobre las cuales se realizó el trabajo analítico, son las siguientes:

GOTAS

Clorhidrato de Fenilefrina	250 mg.
Maleato de Clorfeniramina	100 mg.
Acetaminofenol	15,000 mg
Vehículo c.b.p.	100 ml.

JARABE

Clorhidrato de Fenilefrina	50 mg.
Maleato de Clorfeniramina	20 mg.
Acetaminofenol	3,000 mg.
Vehículo c.b.p.	100 mg.

APARATOS Y MATERIALES

Cromatógrafo de Líquidos Waters mod. 204, equipado-- con detector UV mod. 440, bombas MGK-6000, inyector automático mod. 710-B, programador de solventes mod. 600 y módulo de datos mod. 730.

Baño de ultrasonido Cole-Parmer.

Filtro Sartorius GmbH.

Membrana tipo GS para filtrar solventes acuosos, poro 0.22 μ .

Membrana tipo FG para filtrar solventes orgánicos, poro 0.2 μ .

Membrana tipo FH para filtrar las muestras, poro - -
0.5 μ .
Prefiltro tipo HA.

REACTIVOS

Metanol Uvasol (Merck)
Acido acético al 2% (v/v).

A.- DETERMINACION CUANTITATIVA DE CLORHIDRATO DE FENILEFRINA-
Y MALEATO DE CLORFENIRAMINA POR CLAR EN GOTAS Y JARABE.

I. Preparación.

Solución de Referencia.

Pesar exactamente alrededor de 50 mg. de clorhidrato de fenilefrina y 20 mg. de maleato de clorfeniramina estándares de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de - 100 ml, llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien.- (Conc. 0.5 mg/ml clorhidrato de fenilefrina, 0.2 mg/ml maleato de clorfeniramina).

Solución de Referencia Interna.

Pesar exactamente alrededor de 30 mg. de dulcolan[†] estándar de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico - de 50 ml, disolver y llevar al volumen con metanol uvasol. -- Mezclar bien. (Conc. 0.6 mg/ml). *4,4'-diacetoxi-difenil-(piridil-2)-metano.

Solución Factor Respuesta

Pipetear por duplicado 10 ml. de la solución de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. añadir 1 ml. de la solución de referencia interna, llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien. (Conc. 0.1 mg/ml -- clorhidrato de fenilefrina, 0.04 mg/ml. maleato de clorfeniramina, 0.012 mg/ml dulcolan). Marcar R_1 y R_2 .

Solución Problema - Gotas

Pipetear por duplicado 2 ml. de la muestra, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. añadir 1 ml. de la solución de referencia interna, llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien (Conc. 0.1 mg/ml clorhidrato de fenilefrina, 0.04 mg/ml maleato de clorfeniramina, 0.02 mg/ml dulcolan). Marcar G_1 y G_2 .

Solución Problema - Jarabe

Pipetear por duplicado 10 ml. de la muestra, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. añadir 1 ml. de la solución de referencia interna, llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien. (Conc. 0.1 mg/ml clorhidrato de fenilefrina, 0.04 mg/ml maleato de clorfeniramina, 0.012 mg/ml -- dulcolan). Marcar J_1 y J_2 .

+ Filtrar las soluciones R_1 , R_2 , G_1 , G_2 , J_1 y J_2 por membrana FH, usar prefiltro.

II. Parámetros Instrumentales

1. Condiciones.

Fase móvil: 50% Metanol uvasol: 50% ácido acético al-
2%, filtrada y de degasificada.

Flujo : 1.0 ml/min.

Columna : 30 cm x 3.9 mm (d.i.) de acero inoxidable
empacada con μ -Bondapack CN (Waters).

Detector : 254 nm UV, 0.02 UA

Presión : aprox. 1,000 - 1,500 psi

Velocidad
de Carta : 0.25 cm/min

Volumen de
inyección : 20 mcl.

Tiempo de-
corrida : 20 min.

2. Tiempos de Retención.

Clorhidrato de Fenilefrina = 6.7 min

Maleato de Clorfeniramina = 15.5 min

Dulcolan (estandar interno)=10.8 min
(ver figura No. 4).

3.- Análisis.

Injectar por duplicado 20 mcl de las soluciones R₁, -
R₂, G₁, G₂, J₁, J₂.

III. Cálculos

1. Factor Respuesta (K)

1.1. Factor respuesta para Clorhidrato de Fenilefrina (K_1)

$$K_1 = \frac{AF}{Ad} \times \frac{Wd}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{100}{WF} \times \frac{50}{10}$$

6

$$K_1 = \frac{AF}{Ad} \times \frac{Wd}{WF} \times 0.2$$

Donde:

A_f = area o altura del pico del clorhidrato de fenilefrina en la solución factor respuesta.

A_d = area o altura del pico del dulcolan en la solución factor respuesta.

W_f = peso en mg. del clorhidrato de fenilefrina estándar de referencia.

W_d = peso en mg. del dulcolan estándar interno.

0.2 = factor de dilución.

1.2. Factor Respuesta para Maleato de Clorfeniramina (K_2)

$$K_2 = \frac{Ac}{Ad} \times \frac{Wd}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{100}{Wc} \times \frac{50}{10}$$

6

$$K_2 = \frac{Ac}{Ad} \times \frac{Wd}{Wc} \times 0.2$$

Donde:

A_c = area o altura del pico del maleato de clorfeniramina en la solución factor respuesta.

A_d = area o altura del pico del dulcolan en la solución factor respuesta.

W_c = peso en mg. del maleato de clorfeniramina estandar de referencia.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

0.2 = factor de dilución.

2. Cálculos de Clorhidrato de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina.

2.1 mg/ml de Clorhidrato de Fenilefrina en las Gotas.

$$\frac{A_m}{A_d} \times \frac{W_d}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{50}{2} \times \frac{1}{K_1}$$

6

$$\frac{A_m}{A_d} \times \frac{W_d}{K_1} \times 0.01$$

Donde:

A_m = área del pico o altura del clorhidrato de fenilefrina en la solución problema.

A_d = área del pico o altura del dulcolan en la solución problema.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

K_1 = factor respuesta para clorhidrato de fenilefrina.

0.01=factor de dilución.

2.2 mg/ml de Maleato de Clorfeniramina en las Gotas.

$$\frac{An}{Ad} \times \frac{Wd}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{50}{2} \times \frac{1}{K_2}$$

6

$$\frac{An}{Ad} \times \frac{Wd}{K_2} \times 0.01$$

Donde:

An = area o altura del pico de maleato de clorfeniramina en la solución problema.

A_d = area o altura del pico de dulcolan en la solución problema.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

K_2 = factor respuesta para maleato de clorfeniramina

0.01=factor de dilución.

2.3 mg/ml de Clorhidrato de Fenilefrina en el Jarabe.

$$\frac{Am'}{Ad} \times \frac{Wd}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{50}{10} \times \frac{1}{K_1}$$

6

$$\frac{A_m'}{A_d} \times \frac{W_d}{K_1} \times 0.002$$

Donde:

A_m' = area o altura del pico de clorhidrato de fenilefrina en la solución problema.

A_d = area o altura del dulcolan en la solución problema.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

K_1 = factor respuesta para clorhidrato de fenilefrina.

0.002=factor de dilución.

2.4 mg/ml de Maleato de Clorfeniramina en el Jarabe.

$$\frac{A_n'}{A_d} \times \frac{W_d}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{50}{10} \times \frac{1}{K_2}$$

6

$$\frac{A_n'}{A_d} \times \frac{W_d}{K_2} \times 0.002$$

Donde:

A_n' = area o altura del pico de maleato de clorfeniramina en la solución problema.

A_d = area o altura del pico de dulcolan en la solución problema.

K_2 = factor respuesta para maleato de clorfeniramina.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

0.002=factor de dilución.

B. DETERMINACION CUANTITATIVA DE ACETAMINOFENOL POR CLAR EN-GOTAS Y JARABE.

I. Preparación.

Solución de Referencia

Pesar exactamente alrededor de 300 mg. de acetaminofenol estandar de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. disolver y llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien. (Conc. 6 mg/ml).

Solución Factor Respuesta

Pesar por duplicado exactamente alrededor de 60 mg. - de dulcolan estandar de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. respectivamente, añadir 20 ml. de metanol uvasol, agitar hasta completa disolución, añadir a cada-matraz 2 ml de la solución de referencias, llevar al volumen-con metanol uvasol. Mezclar bien (Conc. 0.24 mg/ml acetaminofenol, 1.2 mg/ml dulcolan). Marcar R_1 y R_2 .

Solución Problema - Gotas

Pipetear 2 ml. de la muestra, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. llevar al volumen con metanol uva-

sol. (M_1) Aparte, pesar por duplicado exactamente alrededor de 60 mg de dulcolan estandar de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. respectivamente, añadir 20 ml de metanol uvasol, agitar hasta completa disolución, añadir a cada matraz 2 ml. de la solución M_1 , llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien. (Conc. 0.24 mg/ml acetaminofenol, 1.2 mg/ml dulcolan). Marcar G_1 y G_2 .

Solución Problema - Jarabe

Pipetear 10 ml. de la muestra, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien. (M_2).

Aparte, pesar por duplicado exactamente alrededor de 60 mg. de dulcolan estandar de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. respectivamente, añadir 20 ml. de metanol uvasol, agitar hasta completa disolución, añadir a cada matraz 2 ml. de la solución M_2 , llevar al volumen con metanol uvasol. Mezclar bien. (Conc. 0.24 mg/ml acetaminofenol, 1.2 mg/ml dulcolan). Marcar J_1 y J_2 .

+ Filtrar las soluciones R_1 , R_2 , G_1 , G_2 , J_1 y J_2 por membrana FH, usar prefiltro.

II. Parámetros Instrumentales

1. Condiciones

Fase móvil : 35% Metanol uvasol: 65% Acido Acético--
al 2%, filtrada y degasificada.

Flujo : 1.0 ml/min.

Columna : 30 cm x 3.9 mm (d.i) de acero inoxidable em
pacada con μ -Bondapack CN⁻. (Waters).

Detector: 254 nm UV, 1.0 UA

Presión : aprox. 1,000 - 1,500 psi

Velocidad
de carta: 0.25 cm/min

Volumen -
de inyec-
ción : 10 mcl

Tiempo de
corrida : 20 min.

2. Tiempos de Retención.

Acetaminofenol = 3.8 min

Dulcolan (estandar interno) = 13.7 min

(Ver figura 5)

3. Análisis

Inyectar por duplicado 10 mcl de las soluciones R₁, R₂
G₁, G₂, J₁, J₂.

III. Cálculos

1. Factor Respuesta (K)

1.1. Factor Respuesta para Acetaminofenol (K₃)

$$K_3 = \frac{A_a}{A_d} \times \frac{W_d}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{50}{W_a} \times \frac{50}{2}$$

ó

$$K_3 = \frac{A_a}{A_d} \times \frac{W_d}{W_a} \times 0.5$$

Donde:

A_a = area o altura del pico del acetaminofenol en la solución factor respuesta.

A_d = area o altura del pico del dulcolan en la solución factor respuesta.

W_a = peso en mg. del acetaminofenol estandar de referencia.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

K_3 = factor respuesta para acetaminofenol.

0.5 = factor de dilución.

2. Cálculos de Acetaminofenol.

2.1 mg/ml de Acetaminofenol en las Gotas.

$$\frac{A_a}{A_d} \times \frac{W_d}{50} \times \frac{50}{2} \times \frac{50}{2} \times \frac{1}{K_3}$$

6

$$\frac{A_a}{A_d} \times \frac{W_d}{K_3} \times 12.5$$

Donde:

A_a = area o altura del pico del acetaminofenol en la solución problema.

A_d = area o altura del pico del dulcolan en la solución problema.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

K_3 = factor respuesta para acetaminofenol.

12.5 = factor de dilución.

2.2 mg/ml de Acetaminofenol en Jarabe.

$$\frac{A_a}{A_d} \times \frac{W_d}{50} \times \frac{50}{10} \times \frac{50}{2} \times \frac{1}{K_3}$$

ó

$$\frac{A_a}{A_d} \times \frac{W_d}{K_3} \times 2.5$$

Donde:

A_a = area o altura del pico de acetaminofenol en la solución problema.

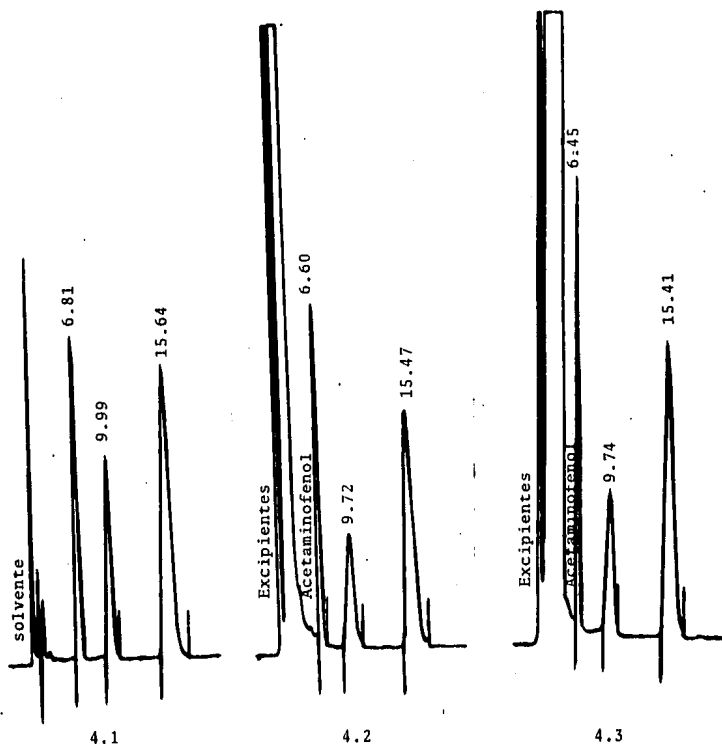
A_d = area o altura del pico del dulcolan en la solución problema.

W_d = peso en mg. del dulcolan estandar interno.

K_3 = factor respuesta para acetaminofenol.

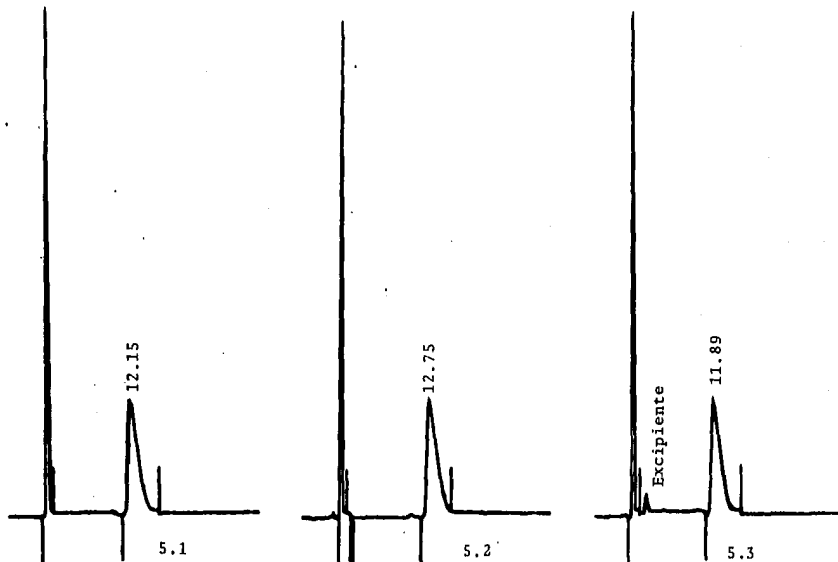
2.5 = factor de dilución.

Figura 4. Determinación de Clorhidrato de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina



- 4.1 Solución factor respuesta para clorhidrato de fenilefrina y maleato de clorfeniramina, clorhidrato de fenilefrina = 6.81 TR; maleato de clorfeniramina = 15.64 TR; estandar interno 9.99 TR
- 4.2 Solución Problema, Gotas clorhidrato de fenilefrina = 6.60 TR; maleato de clorfeniramina 15.47 TR; estandar interno = 9.72 TR.
- 4.3 Solución Problema - Jarabe. clorhidrato de fenilefrina = 6.45 TR; maleato de clorfeniramina = 15.41 TR; estandar interno = 9.74 TR.

Figura 5. Determinación de Acetaminofenol.



- 5.1 Solución factor respuesta para acetaminofenol. Acetaminofenol = 3.83 TR; estandar interno 12.15 TR.
- 5.2 Solución Problema - Gotas. Acetaminofenol = 3.90 TR; estandar interno 12.75 TR.
- 5.3 Solución Problema - Jarabe. Acetaminofenol = 3.78 TR; estandar interno 11.89

4.- RESULTADOS

A.- ESPECIFICIDAD

Se prepararon diferentes formulaciones para llevar a cabo éste paso de la validación:

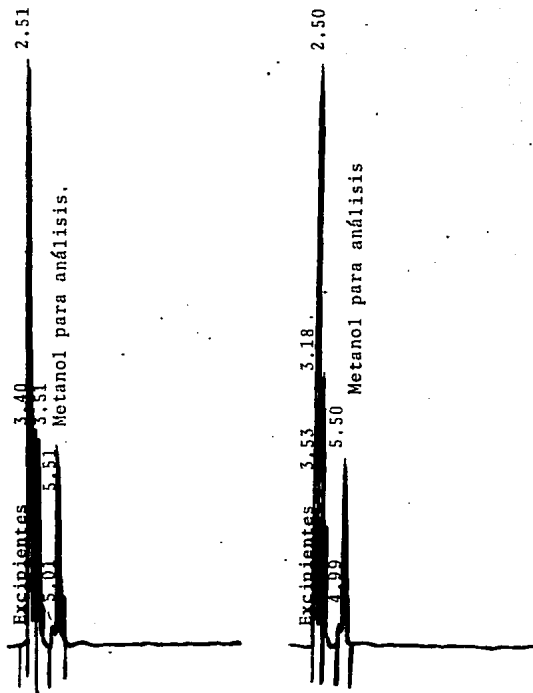
- 1.- Formulación Completa
- 2.- Formulación sin Clorhidrato de Fenilefrina
- 3.- Formulación sin Maleato de Clorfeniramina
- 4.- Formulación sin Acetaminofenol
- 5.- Placebo

Se sometieron las cinco formulaciones a estabilidad-acelerada a temperatura ambiente, 37°C, 55°C y 75°C, por periodos de 3, 7 y 14 días.

Una vez finalizado éste periodo se realizó el análisis para cada formulación de acuerdo a los métodos desarrollados.

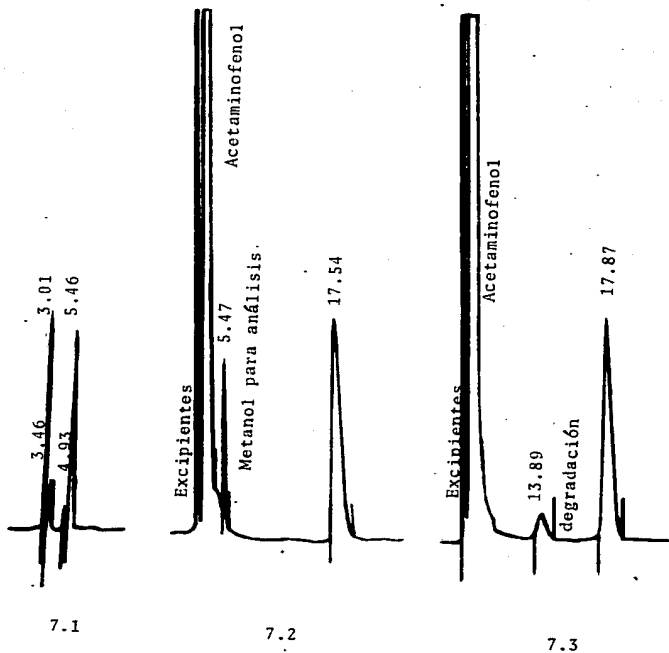
A continuación se muestran cromatogramas obtenidos a los 14 días ya que éstos son más representativos para determinar la especificidad de los métodos.

Figura 6. Gotas



6.1 Placebo a temperatura ambiente

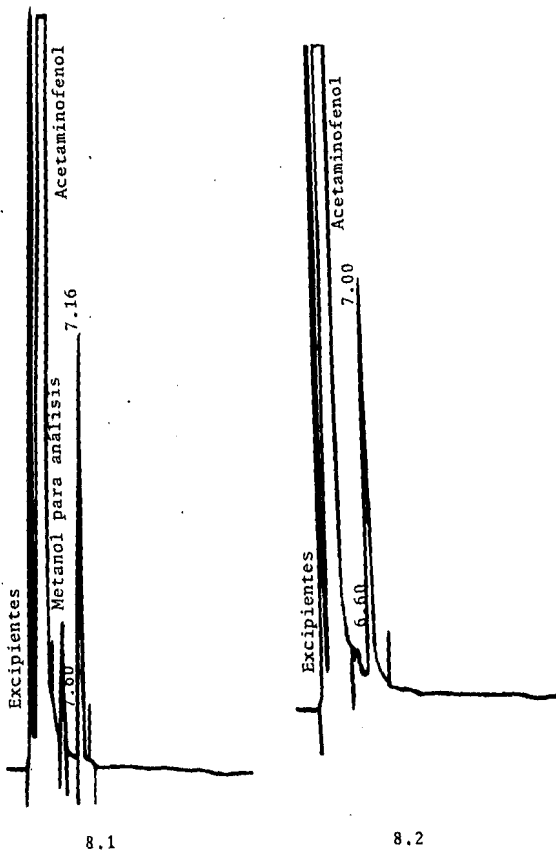
6.2 Placebo a 55°C, 14 días.



7.1. Metanol para análisis

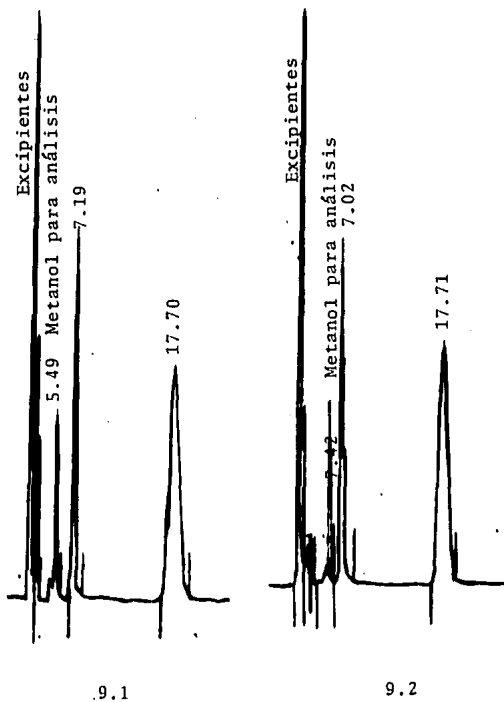
7.2. Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a temperatura ambiente; maleato de clorfeniramina = 17.54 TR.

7.3. Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a 55°C, 14 días; maleato de clorfeniramina = 17.87 TR.

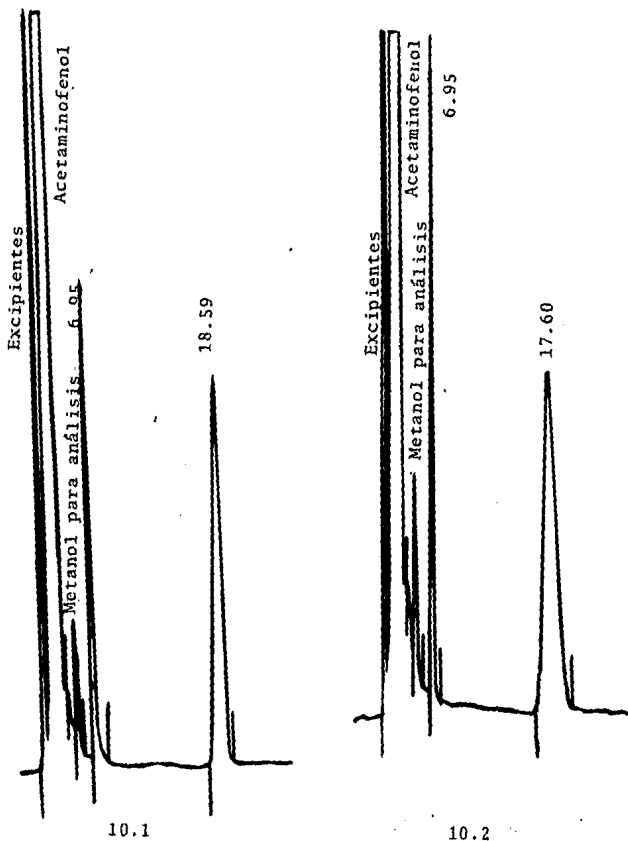


- 8.1. Formulaci3n sin maleato de clorfeniramina a temperatura ambiente; clorhidrato de fenilefrina = 7.16 TR.
- 8.2. Formulaci3n sin maleato de clorfeniramina a 55°C 14 - - d1as; clorhidrato de fenilefrina = 7.00 TR.

Figura 9. Gotas.

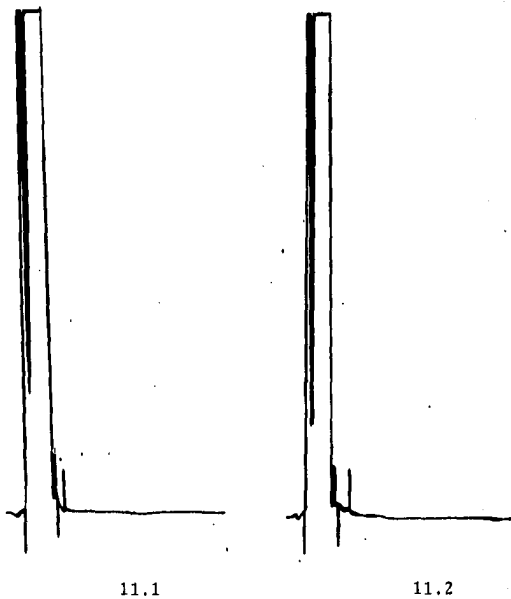


- 9.1 Formulación sin acetaminofenol a temperatura ambiente; clorhidrato de fenilefrina = 7.19 TR, maleato de clorfeniramina = 17.70 TR.
- 9.2 Formulación sin acetaminofenol a 55°C, 14 días; clorhidrato de fenilefrina = 7.02 TR, maleato de clorfeniramina = 17.71 TR.



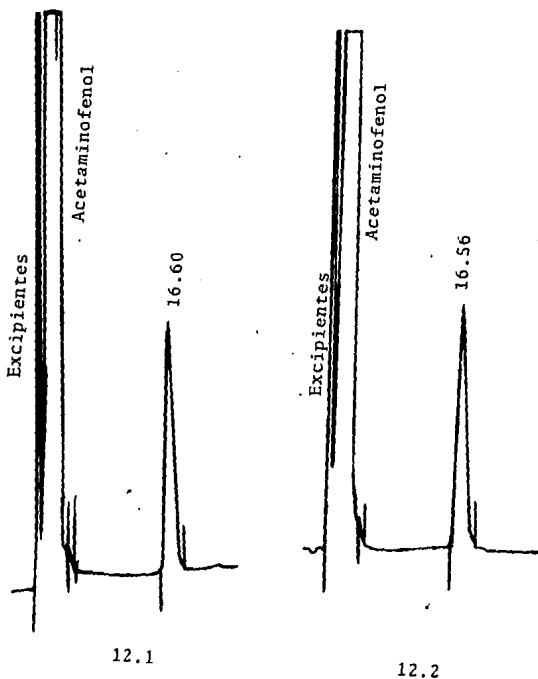
- 10.1 Formulación Completa. Clorhidrato de fenilefrina -- = 6.95 TR, maleato de clorfeniramina = 18.59 TR; sometido a temperatura ambiente.
- 10.2 Formulación completa. Clorhidrato de fenilefrina -- = 6.95 TR, maleato de clorfeniramina = 17.60 TR, a 55°C 14 días.

Figura 11. Jarabe



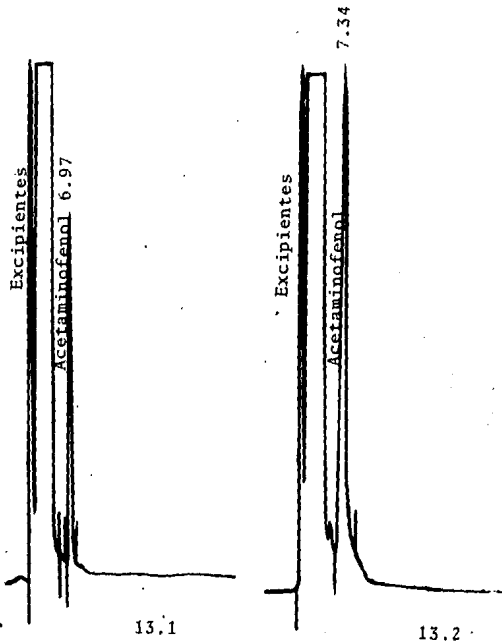
11.1 Placebo a temperatura ambiente,

11.2 Placebo a 55°C, 14 días.



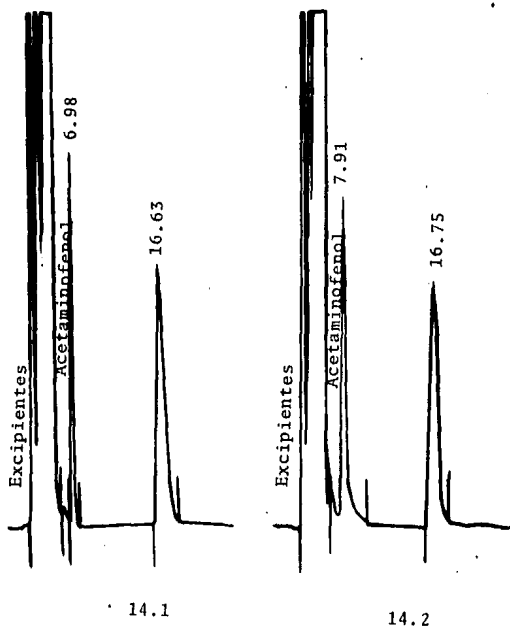
- 12.1 Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a temperatura ambiente; maleato de clorfeniramina = 16.68 TR.
- 12.2 Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a 55°C, 14 días; maleato de clorfeniramina 16.56 TR.

Figura 13. Jarabe



- 13.1 Formulación sin maleato de clorfeniramina a temperatura ambiente; clorhidrato de fenilefrina = 6.97 TR.
- 13.2 Formulación sin maleato de clorfeniramina a 55°C, 14 días; clorhidrato de fenilefrina = 7.34 TR.

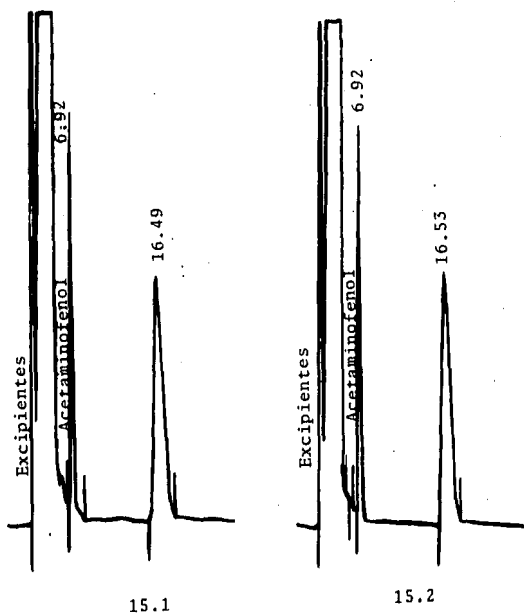
Figura 14. Jarabe



14.1 Formulación sin acetaminofenol a temperatura ambiente; clorhidrato de fenilefrina = 6.98 TR, maleato de clorfeniramina = 16.63 TR.

14.2 Formulación sin acetaminofenol a 55°C, 14 días; clorhidrato de fenilefrina = 7.01 TR, maleato de clorfeniramina = 16.75 TR.

Figura 15. Jarabe



15.1 Formulación completa a temperatura ambiente; clorhidrato de fenilefrina = 6.95 TR, maleato de clorfeniramina = 16.49 TR.

15.2 Formulación completa a 55°C, 14 días; clorhidrato de fenilefrina = 6.92 TR, maleato de clorfeniramina = 16.53 TR.

Figura 16. Gotas



16.1



16.2

16.1 Formulación sin acetaminofenol a temperatura ambiente.

16.2 Formulación sin acetaminofenol a 55°C, 14 días.



16.3

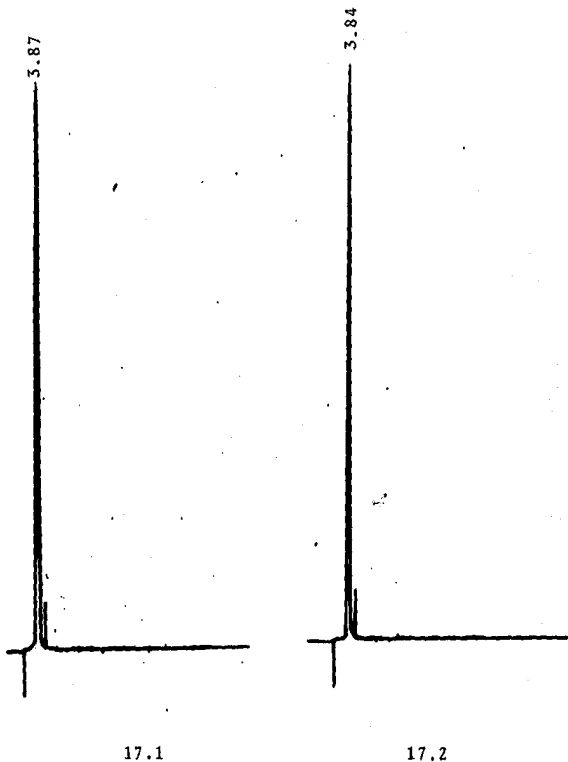


16.4

16.3 Placebo a temperatura ambiente

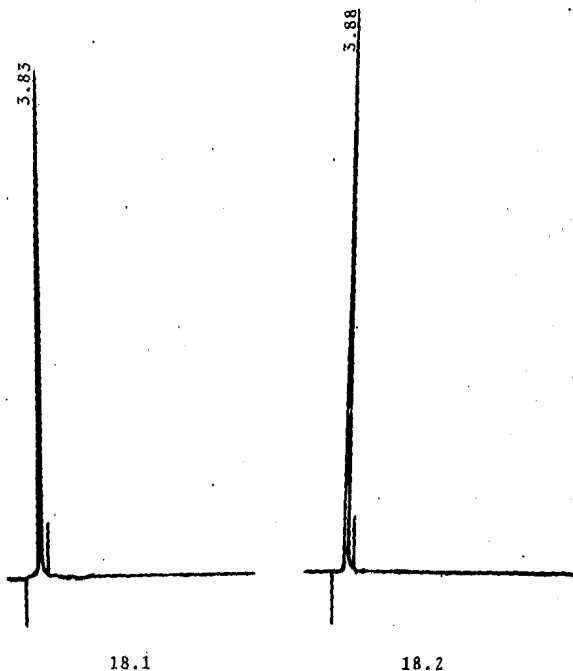
16.3 Placebo a 55°C, 14 días.

Figura 17. Gotas



- 17.1 Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a temperatura ambiente; acetaminofenol = 3.84 TR.
- 17.2 Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a 55°C, 14 días; acetaminofenol = 3.84 TR.

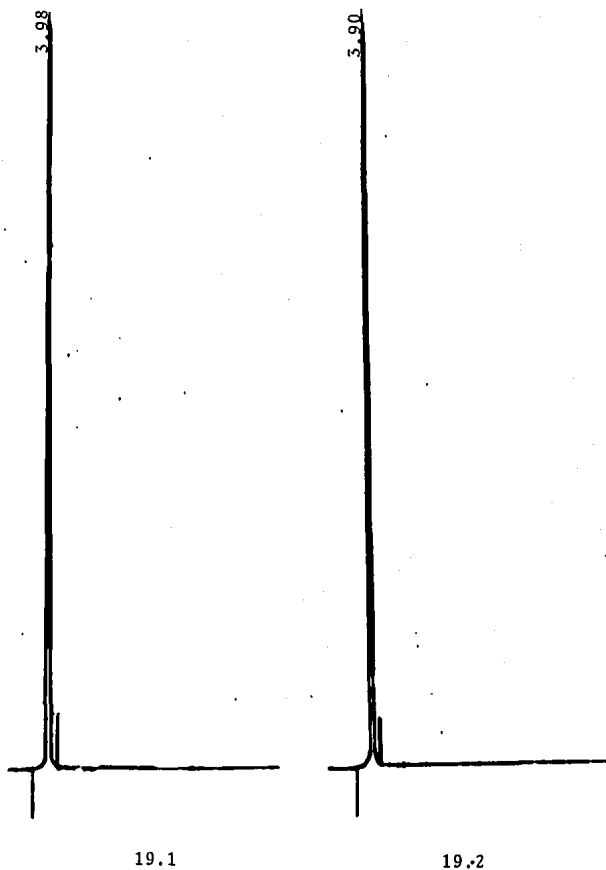
Figura 18. Gotas



18.1 Formulación sin maleato de clorfeniramina a temperatura ambiente; acetaminofenol = 3.83 TR.

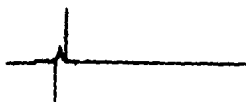
18.2 Formulación sin maleato de clorfeniramina a 55°C, 14 días; acetaminofenol = 3.88 TR.

Figura 19. Gotas



- 19.1 Formulaci3n completa a temperatura ambiente, acetaminofenol = 3.90 TR.
- 19.2 Formulaci3n completa a 55°C, 14 d3as, acetaminofenol = -- 3.90 TR.

Figura 20. Jarabe



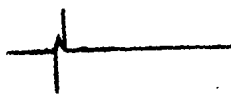
20.1



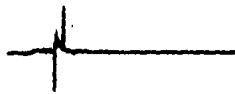
20.2

20.1 Formulación sin acetaminofenol a temperatura ambiente.

20.2 Formulación sin acetaminofenol a 55°C, 14 días.



20.3

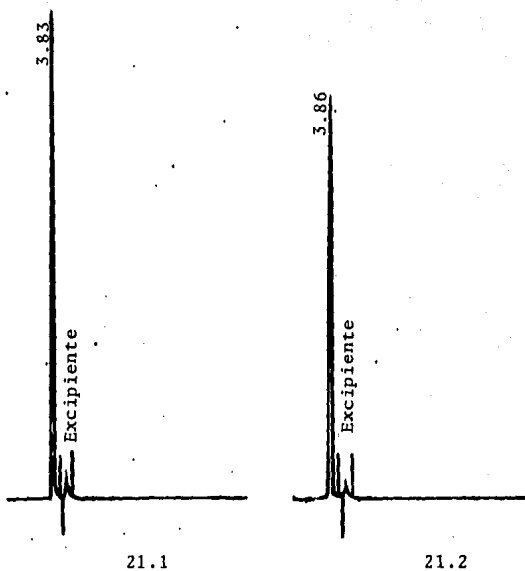


20.4

20.3 Placebo a temperatura ambiente.

20.4 Placebo a 55°C, 14 días.

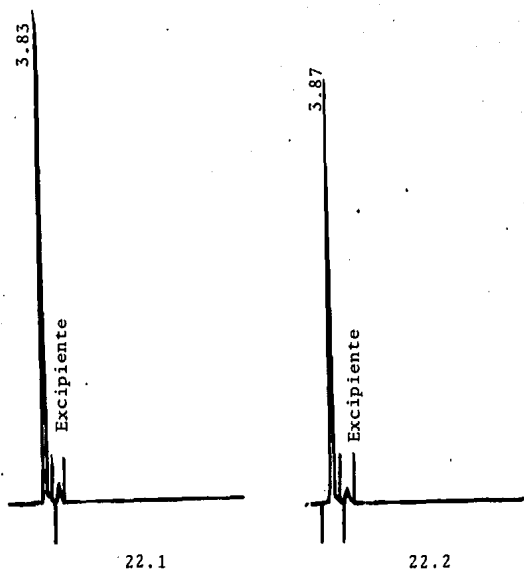
Figura 21. Jarabe



21.1 Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a temperatura ambiente; acetaminofenol = 3.83 TR.

21.2 Formulación sin clorhidrato de fenilefrina a 55°C, 14 días; acetaminofenol = 3.86 TR.

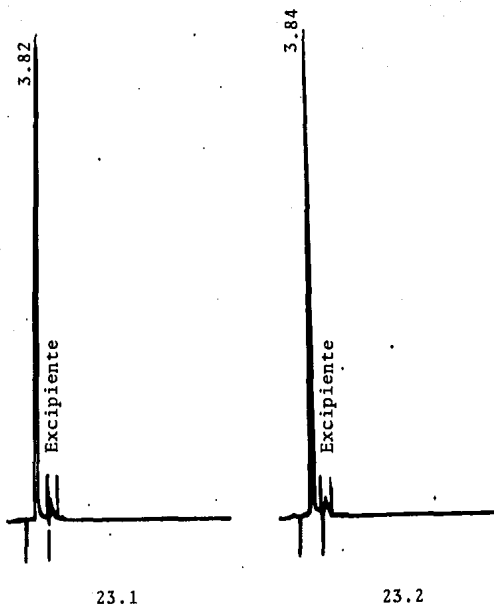
Figura 22. Jarabe.



22.1 Formulación sin maleato de clorfeniramina a temperatura ambiente; acetaminofenol = 3.83 TR.

• 22.2 Formulación sin maleato de clorfeniramina a 55°C, 14 días; acetaminofenol = 3.87 TR.

Figura 23. Jarabe.



- 23.1 Formulación completa a temperatura ambiente; acetaminofenol = 3.82 TR.
- 23.2 Formulación completa a 55°C, 14 días; acetaminofenol = 3.84 TR.

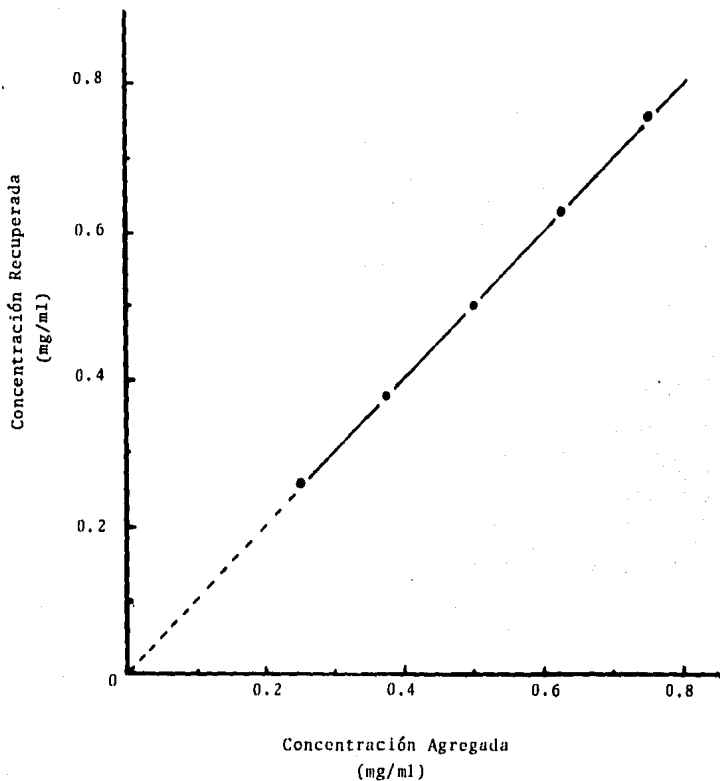
B. - LINEARIDAD

Se corrió la Linearidad para cada uno de los principios activos contenidos en las dos presentaciones farmacéuticas siguiendo los métodos analíticos desarrollados.

Se prepararon soluciones a concentraciones de 50%, - 75%, 100%, 125% y 150% usando estandares de referencia.

A continuación se muestran los resultados. (ver gráficas No. 1, 2 y 3; tablas No. 1, 2 y 3).

Linealidad del Sistema para: CLORHIDRATO DE FENILEFRINA



GRAFICA 1

Error estándar de regresión = 0.00802%

 $m = 1.001$ $b = 0.0049$ $r = 0.99984$

TABLA No. 1 LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA
CLORHIDRATO DE FENILEFRINA

mg/ml Agredados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
0.250	0.2587	103.5 %
0.375	0.3789	101.0 %
0.500	0.5000	100.0 %
0.625	0.6313	101.0 %
0.750	0.7579	101.0 %

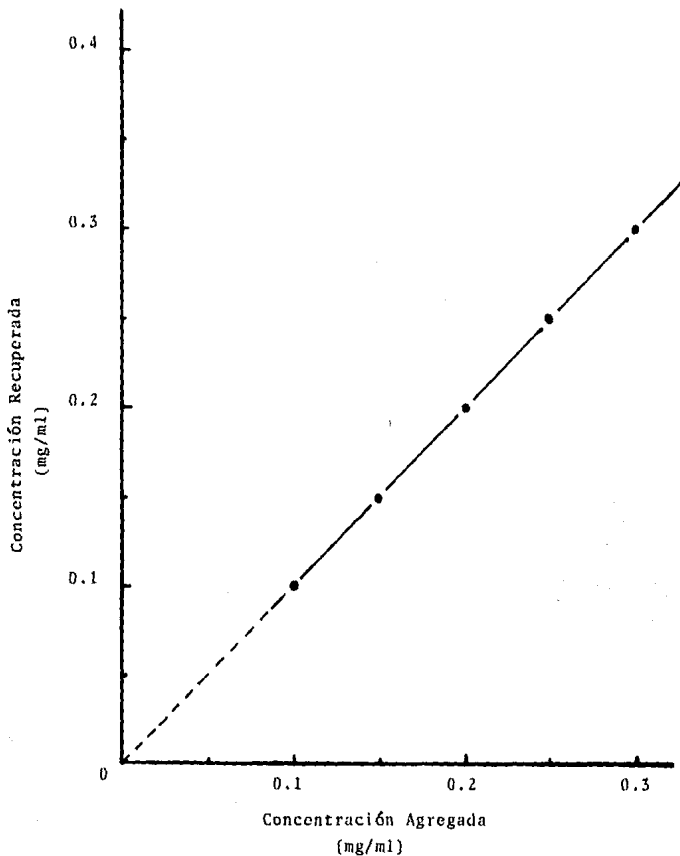
$\bar{X} = 101.3 \%$

$E = 0.261 \%$

$DE = 1.30 \%$

$L95\% = 101.3 \% \pm 0.724 \%$

$CV = 1.29 \%$



GRÁFICA No. 2

Error estandar de regresión = 0.00124 %

$m = 1.002$

$b = 0.00008$

$r = 0.99994$

TABLA No. 2 LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA
MALEATO DE CLORFENIRAMINA

mg/ml Agregados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
0.100	0.1014	101.4
0.150	0.1494	99.6
0.200	0.2000	100.0
0.250	0.2506	100.2
0.300	0.3014	100.5

$$\bar{X} = 100.3$$

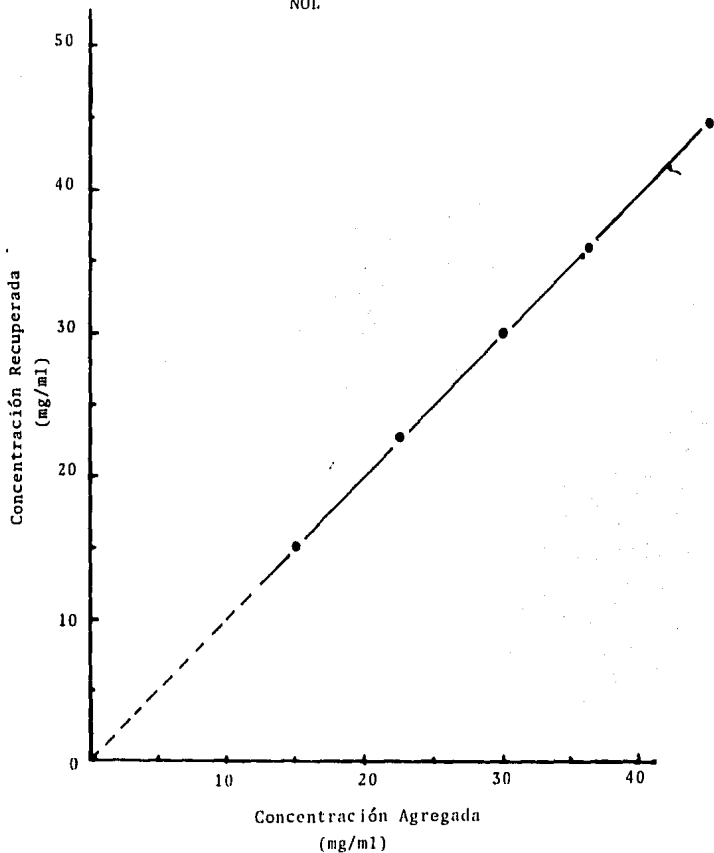
$$E = 0.301 \%$$

$$DE = 0.63 \%$$

$$L 95\% = 100.3 \% \pm 0.835 \%$$

$$CV = 0.67 \%$$

Linealidad del Sistema: PARA LA DETERMINACION DE ACETAMINOFENOL.



GRAFICA No. 3

Error estandar de regresión = 0.2611 %

$m = 0.983$

$b = 0.4706$

$r = 0.99997$

TABLA No. 3 LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA
ACETAMINOFENOL

mg/ml Agregados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
45.00	44.713	99.4
37.50	37.243	99.3
30.00	30.000	100.0
22.50	22.702	100.9
15.00	15.124	100.8

$$\bar{X} = 100.1$$

$$E = 0.337 \%$$

$$DE = 0.75$$

$$L\ 95\ \% = 100.1 = 0.935 \%$$

$$CV = 0.75$$

B.- EXACTITUD Y PRESICION DEL METODO

Se prepararon 6 muestras a concentraciones de 80% y 120% para cada uno de los principios activos manteniendo - - constante la concentración del placebo de las gotas y el jarabe.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas - No. 4 y 5.

TABLA No. 4

EXACTITUD - GOTAS

No. Muestra	Clorhidrato de Fenilefrina		Maleato de Clorfeniramina		Acetaminofenol	
	80 %	120 %	80 %	120 %	80 %	120 %
1	99.5	101.1	98.3	101.1	105.6	99.4
2	97.1	100.8	97.5	101.8	105.9	99.6
3	100.1	101.6	99.8	102.0	105.6	100.4
4	99.9	100.5	100.2	100.4	105.3	101.4
5	100.1	100.3	100.0	100.3	105.8	100.4
6	100.4	101.5	100.3	100.2	105.7	101.1
\bar{X}	99.5	100.97	99.4	101.0	105.6	100.4
DE %	1.22	0.53	1.17	0.73	0.21	0.80
CV %	1.23	0.52	1.18	0.72	0.20	0.79
E %	0.498	0.216	0.478	0.298	0.086	0.326

TABLA No. 5

EXACTITUD - JARABE

No. Muestra	Clorhidrato de Fenilefrina		Maleato de Clorfeniramina		Acetaminofenol	
	80 %	120 %	80 %	120 %	80 %	120 %
1	97.4	102.4	98.1	101.7	102.3	100.6
2	97.2	104.8	98.2	102.2	103.6	99.9
3	97.2	104.5	97.1	102.9	101.3	100.8
4	96.6	103.6	97.5	102.5	103.3	100.5
5	98.2	102.8	98.4	102.9	102.9	102.2
6	97.2	103.3	97.5	103.6	103.0	101.1
\bar{X}	97.3	103.6	97.8	102.6	102.7	100.8
DE %	0.54	0.94	0.52	0.66	0.83	0.77
CV %	0.56	0.91	0.51	0.64	0.81	0.76
E %	0.220	0.384	0.212	0.269	0.339	0.314

D.- REPRODUCIBILIDAD

Se prepararon 5 muestras para cada una de las presentaciones farmacéuticas (gotas y jarabe) conforme a los métodos desarrollados.

El ensayo se llevó a cabo en dos días diferentes; en las tablas No. 6, 7, 8 y 9 se muestran los resultados.

TABLA No. 6

REPRODUCIBILIDAD - GOTAS

Día	Químico	Clorhidrato de Fenilefrina mg/ml		Maleato de Clorfeniramina mg/ml	
		Recuperados	% Etiquetado	Recuperados	% Etiquetado
1	A	2.785	111.4	0.985	98.5
1	A	2.800	112.0	0.989	98.9
1	A	2.793	111.7	0.997	99.7
1	A	2.811	112.4	1.005	100.5
1	A	2.812	112.5	1.011	101.1
2	A	2.806	112.2	0.991	99.1
2	A	2.746	109.8	0.960	96.0
2	A	2.752	110.1	0.962	96.2
2	A	2.738	109.5	0.969	96.9
2	A	2.818	112.7	0.960	96.0
	X (%)		111.43		98.29
	DE (%)		1.19		1.90
	DER (%)		1.07		0.94

* Conc. Teórica de Clorhidrato de Fenilefrina = 2.5 mg/ml

* Conc. Teórica de Maleato de Clorfeniramina = 1.0 mg/ml.

TABLA No. 7 REPRODUCIBILIDAD - GOTAS

Día	Químico	Acetaminofenol	
		mg/ml Recuperados	10/0 Etiquetado
1	A	150.74	100.50
1	A	147.62	98.40
1	A	150.90	100.60
1	A	147.33	98.20
1	A	145.65	97.10
2	A	148.14	98.70
2	A	147.87	98.60
2	A	150.55	100.40
2	A	149.87	99.90
2	A	146.9	97.9
	X	%	99.03
	DE	%	1.23
	DER	%	1.24

* Conc. teórica de Acetaminofenol = 150 mg/ml

TABLA No. 8

REPRODUCIBILIDAD - JARABE

Día	Químico	Clorhidrato de Fenilefrina		Maleato de Clorfeniramina	
		mg/ml Recuperados	% Etiquetado	mg/ml Recuperados	% Etiquetado
1	A	0.5895	117.9	0.1938	96.9
1	A	0.5837	116.7	0.1967	98.4
1	A	0.5876	117.5	0.1944	97.2
1	A	0.5882	117.6	0.1959	97.9
1	A	0.5885	117.7	0.1962	98.1
2	A	0.5775	115.5	0.1936	96.8
2	A	0.5739	114.8	0.1963	98.2
2	A	0.5770	115.4	0.1979	98.9
2	A	0.5840	116.8	0.1998	99.9
2	A	0.5838	116.8	0.1994	99.7
	X		116.67		98.20
	DE		1.09		1.08
	DER		0.93		1.09

* Conc. Teórica de Clorh. de Fenilefrina = 0.500 mg/ml

* Conc. Teórica de Maleato de Clorfeniramina = 0.2 mg/ml.

TABLA No. 9 REPRODUCIBILIDAD - JARABE

Día	Químico	Acetaminofenol	
		mg/ml Recuperados	% Etiquetado
1	A	30.126	100.4
1	A	30.038	100.1
1	A	30.190	100.6
1	A	30.630	102.1
1	A	30.457	101.5
2	A	30.407	101.3
2	A	30.478	101.6
2	A	30.427	101.4
2	A	30.589	101.9
2	A	30.591	102.0
	X	%	101.29
	DE	%	0.70
	DER	%	0.69

* Conc. teórica de Acetaminofenol = 30 mg/ml

5.- CONCLUSIONES

Del análisis estadístico de los datos obtenidos en la validación se puede decir que los métodos desarrollados son:

1.- Específicos: Para cuantificar los tres activos contenidos en las dos presentaciones farmacéuticas, ya que -- los métodos son capaces de separar los excipientes y productos de descomposición generados en las muestras expuestas a - 55°C, durante 14 días, de las sustancias de interés.

2.- Lineales: Para los tres activos en estudio, demostrado por los coeficientes de correlación obtenidos, los - cuales son mayores que el 0.99 estipulado en el criterio de - aceptación para esta prueba.

3.- Exactos y Precisos: Por que se observa que los - coeficientes de variación (CV) para clorhidrato de Fenilefrina, maleato de Clorfeniramina y Acetaminofenol determinados a partir de los datos de recobros, a dos concentraciones diferentes (80% y 120% de la cantidad etiquetada) para cada uno - de los activos, cumplen con el criterio establecido.

4.- Reproducibles: Porque se obtuvieron coeficientes de variación (CV) dentro de los lineamientos establecidos (CV = 2%) para determinaciones repetidas de un mismo lote de cada una de las presentaciones farmacéuticas en estudio analizados en dos días diferentes.

Por lo anteriormente expuesto, se puede concluir que los métodos desarrollados son confiables, precisos, exactos y

específicos, pudiendo ser utilizados para cuantificar clorhidrato de Fenilefrina, maleato de Clorfeniramina y Acetaminofenol, en presencia de sus productos de degradación, en caso de presentarlos, contenidos en jarabes y solución gotas, cumpliendo con ésto con el objetivo planteado en éste trabajo.

6.- BIBLIOGRAFIA

1. Steveson, R. and Johnson, B.L.
Basic Liquid Chromatography
Varian Associates
U.S.A. 1978.
2. Snyder, L.R. and Kirkland, J.J.
Introduction to Modern Liquid Chromatography
Second edition, Jhon Willey & Sons, Inc.
U.S.A. 1979.
3. R.W. Yost; L.S. Ettre; R.D. Conlon.
Introducción a la Cromatografía Líquida Básica
Perkin - Elmer, 1980.
4. A. Pryde and M.T. Gilbert
Applications of High Performance Liquid Chromatography
Edit. Chapman and Hall, 1979
5. Goodman, L.S. and Gilman, A.
The Pharmacological Basis of Therapeutics
Fifth Edition. Mac Millan Publishing, Co. Inc.
New York, 1975.
6. Clarke, E.G.C.
Isolation and Identification of Drugs
The Pharmaceutical Press
London, 1969.

7. Martindale
The Extra Pharmacopeia
Twenty - sixth Edition
London, 1977.
8. The Index - Merck
Ninth Edition, 1976.
9. British Pharmacopeia, 1980.
10. The United States Pharmacopeia XIX
Mack Publishing Co.
Easton P.A., 1975.
11. Curso Básico de Cromatografía en Capa Delgada
Merck - México, S.A, 1981.
12. Adrianus J. Vanderwielen and Edward A. Hardwidge
Guidelines for assay Validation
Pharmaceutical Tecnology March, 1982.
13. Aguilar Gil S. Graciela
Resumen de Validación de Métodos Analíticos
México, 1981.
14. Aguilar Gil S. Graciela
Guidelines for Method Validation
México, 1983.

**Esta Tesis se imprimió en Enero de 1985
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A.,
Av. Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-21-05 523-03-33 México 03100, D. F.**