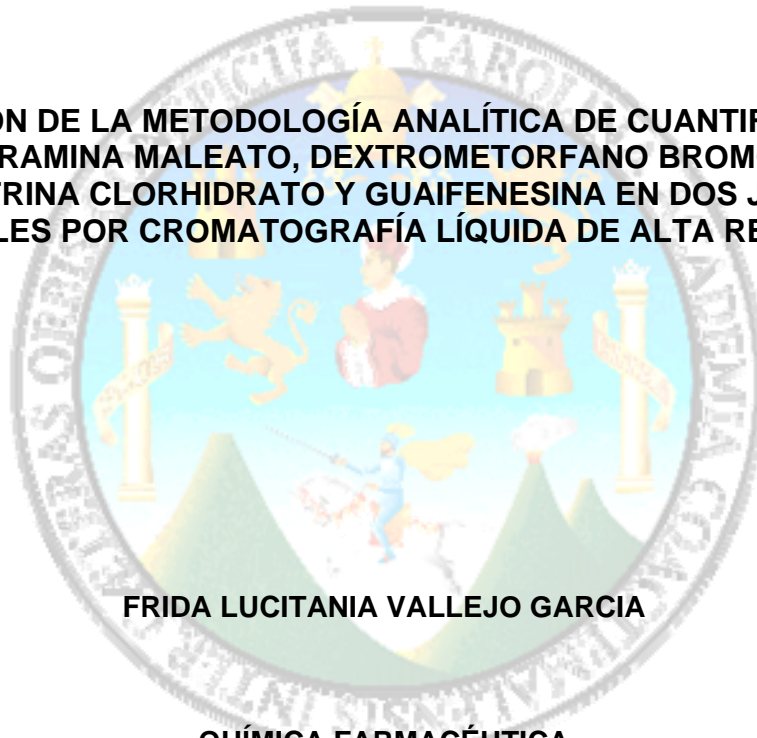


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**“VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DE CUANTIFICACIÓN DE  
CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMOHIDRATO,  
FENILEFRINA CLORHIDRATO Y GUAIFENESINA EN DOS JARABES  
COMERCIALES POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN”**



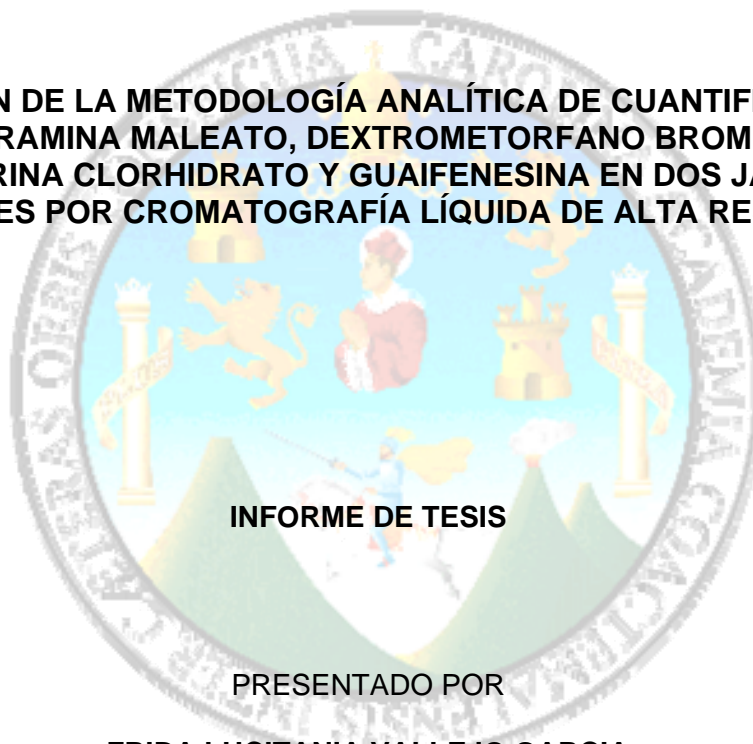
**FRIDA LUCITANIA VALLEJO GARCIA**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**GUATEMALA, ABRIL DE 2009**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**“VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DE CUANTIFICACIÓN DE  
CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO,  
FENILEFRINA CLORHIDRATO Y GUAIFENESINA EN DOS JARABES  
COMERCIALES POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN”**



**INFORME DE TESIS**

PRESENTADO POR

**FRIDA LUCITANIA VALLEJO GARCIA**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA**

GUATEMALA, ABRIL DE 2009.

## **JUNTA DIRECTIVA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

<b>Lic. Oscar Cobar Pinto, Ph.D.</b>	<b>Decano</b>
<b>Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto</b>	<b>Secretario</b>
<b>Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.</b>	<b>Vocal I</b>
<b>Licda. Liliana Vides de Urizar</b>	<b>Vocal II</b>
<b>Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli</b>	<b>Vocal III</b>
<b>Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez</b>	<b>Vocal IV</b>
<b>Br. Aníbal Rodrigo Sevillanos Cambronero</b>	<b>Vocal V</b>

## DEDICATORIA

**A mi amado Señor** con gratitud infinita por sus tantas bendiciones y misericordias que me ha ofrecido. Ha traído muchos cambios a mi vida con paz, bondad y alegría. Y por eso te doy gracias por tus dones y el milagro de tu amor para iluminar mi camino y llegar al final con perseverancia. Te quiero con todo mi corazón....

**A mis padres** José Efraín Vallejo Rivas Q.E.P.D. y Lucy García viuda de Vallejo por brindarme su amor, apoyo incondicional, exhortación y por sus esfuerzos para lograr mi formación profesional y personal.

**A mi hija** Dania Eunice Méndez Vallejo por llegar a mi vida a despertar el amor y la ternura e impulsarme a alcanzar esta meta.

**A mis hermanos y familia** Eddie Stuardo, Edgar Efraín, Hjalmar Elías, Ivan Stuardo, Q.E.P.D., Gueyry Wotsvelí por sus oraciones y apoyo que me alientan y me inspiran, y la confianza que restablece mi fe y seguridad.

**A mis amigos** por darle un toque a mi vida con sus consejos, ánimo, alegría y hacerla especial.

**Y a Usted** gracias por compartir conmigo este triunfo, ¡Qué Dios lo bendiga!

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad y Escuela de Ciencias Químicas y Farmacia, Centro Guatemalteco de Información de Medicamentos -CEGIMED-, Centro de Documentación/Biblioteca de Farmacia -CEDOBF-**

Al cuerpo de catedráticos por transmitirme sus conocimientos y experiencias y al personal administrativo que en una u otra forma participaron en la formación profesional y culminación de mi carrera.

**Al Laboratorio Transnacional de Guatemala**

Al personal administrativo, profesional y técnico por la colaboración integral y proveer el soporte instrumental, préstamo de cristalería, reactivos, espacios necesarios e instalaciones para el desarrollo de este estudio.

**A mi asesores**

Licenciada Ibe Arriola por brindarme su amistad, su invaluable orientación, consejos, sugerencias y por ser la promotora de la realización de esta tesis.

Licenciada Lucrecia Martínez, Licenciada Vivian Sandoval y el Licenciado Estuardo Serrano que con su asesoría y apoyo contribuyeron a mejorar y dar forma a esta investigación.

# ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
<b>1. RESUMEN</b> .....	1 - 2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3 - 4
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	5 - 24
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
7.1 UNIVERSO DE TRABAJO.....	28
7.2 MEDIOS.....	28
7.2.1 RECURSOS HUMANOS.....	28
7.2.2 MATERIALES.....	28 - 29
7.2.3 INSTALACIONES.....	29
7.3 RECURSOS MATERIALES.....	29
7.3.1 EQUIPO.....	29
7.3.2 DATOS DE LA CALIBRACIÓN DEL EQUIPO.....	30
7.3.3 REACTIVOS.....	30
7.3.4 CRISTALERÍA.....	30
7.4 METODOLOGÍA.....	31
7.4.1 CUANTIFICACIÓN DE GUAIFENESINA	
7.4.1.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	31
7.4.1.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN.....	31
7.4.1.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	32
7.4.1.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	32
7.4.1.5 PROCEDIMIENTO.....	32
7.4.1.6 CÁLCULOS.....	32 - 33
7.4.2 CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO	
7.4.2.1 PREPARACION DE REACTIVOS.....	33
7.4.2.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN.....	34
7.4.2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	34
7.4.2.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	34 - 35

7.4.2.5 PROCEDIMIENTO.....	35
7.4.2.6 CÁLCULOS.....	35
7.4.3 CUANTIFICACIÓN DE FENILEFRINA CLORHIDRATO	
7.4.3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	36
7.4.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN.....	36
7.4.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	36 - 37
7.4.3.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	37
7.4.3.5 PROCEDIMIENTO.....	37
7.4.3.6 CÁLCULOS.....	37 - 38
7.4.4 CUANTIFICACIÓN DE DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO	
7.4.3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	38
7.4.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN.....	39
7.4.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	39
7.4.3.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	39
7.4.3.5 PROCEDIMIENTO.....	39
7.4.3.6 CÁLCULOS.....	39
7.4.5 CUANTIFICACIÓN DE FENILEFRINA, DEXTROMETORFANO Y CLORFENIRAMINA EN JARABE A	
7.4.5.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	40 - 41
7.4.5.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN.....	41
7.4.5.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	42
7.4.5.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	42
7.4.5.5 PROCEDIMIENTO.....	42
7.4.5.6 CÁLCULOS.....	42 - 44
7.4.6 CUANTIFICACIÓN DE GUAIFENESINA, DEXTROMETORFANO Y CLORFENIRAMINA EN JARABE B	
7.4.5.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	44 - 45
7.4.5.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN.....	45
7.4.5.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	45
7.4.5.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	45
7.4.5.5 PROCEDIMIENTO.....	46
7.4.5.6 CÁLCULOS.....	46 - 48
7.4.7 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	48 - 51

7.4.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	51 - 54
<b>8. RESULTADOS</b> .....	55 - 64
<b>9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	65 - 68
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	69 - 70
<b>11. RECOMENDACIONES</b> .....	71
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72 - 75
<b>13. ANEXOS</b> .....	76



## 1. RESUMEN

Este trabajo de investigación consiste en la Validación de la Metodología Analítica empleada en el laboratorio para la Cuantificación de Clorfeniramina Maleato, Fenilefrina Clorhidrato, Dextrometorfano Bromohidrato y Guaifenesina en dos Jarabes Comerciales por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Tiene como propósito desarrollar y validar un método analítico que cumpla con los parámetros establecidos de cromatografía y requerimientos de la Farmacopea Estadounidense (USP) e ICH (Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización).

El diseño de este nuevo método sirve de guía a la Industria Farmacéutica para la cuantificación de tres principios activos como materia prima y en un producto terminado; basándose en la cromatografía líquida de alta resolución como una técnica automatizada que permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de los picos en los cromatogramas.

Para determinar que la metodología es exacta y precisa se verificó el cumplimiento de ciertos parámetros de validación que incluyen la exactitud, precisión intermedia, repetibilidad, linealidad del sistema, linealidad del método y especificidad que fueron evaluados durante todo el proceso analítico.

Se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas: cromatógrafo líquido de alta resolución Hitachi, columna Whatman Partisil SCX, fase móvil fosfato diácido de potasio pH 4 y metanol HPLC (40:60), flujo 1 mL/min, longitud de onda de 220 nm y 20  $\mu$ L de volumen de inyección. Se prepararon estándares y muestras a las siguientes concentraciones: Clorfeniramina Maleato 0.08 mg/mL, Dextrometorfano Bromohidrato 0.08 mg/mL, Fenilefrina Clorhidrato 0.04 mg/mL y Guaifenesina 0.4mg/mL.

La metodología analítica cumple con los parámetros de aptitud del sistema, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) para la cuantificación de los principios activos de Clorfeniramina Maleato, Fenilefrina Clorhidrato y

Dextrometorfano Bromohidrato tanto en materia prima como en el Jarabe A y B, pero no demostró ser exacto en la cuantificación de Guaifenesina en el Jarabe B.

Para este proceso se emplearon las instalaciones del laboratorio, que por estar acreditado y cumplir con los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura, así como el equipo e instrumentos validados para desempeñar estas características, y muestras del mismo lote de fabricación, estándares de referencia y reactivos de alta pureza.

En general, el método analítico desarrollado es efectivo y reproducible, cumple con las especificaciones necesarias para su aplicación si se realiza a las mismas condiciones de laboratorio y con los mismos principios activos, permitiendo que se obtengan resultados satisfactorios y confiables.

## 2. INTRODUCCIÓN

El adquirir conocimientos científico-tecnológicos y de medicina contribuye a satisfacer una de las demandas de la sociedad, proporcionar solución a problemas de salud, por medio de medicamentos que en las últimas décadas son reemplazados por fármacos específicos. Dichos medicamentos son elaborados por grandes laboratorios e industrias farmacéuticas; quienes tienen que prestar atención y cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio, así también el control de calidad del producto fabricado es esencial para garantizar al consumidor final un medicamento confiable y seguro.

El constante crecimiento y expansión del mercado exige que las empresas se preparen y busquen la calidad en sus productos y procesos, para utilizarlo como una ventaja competitiva. Lo anterior, aumenta la necesidad de obtener certificaciones que garanticen la calidad del producto, como por ejemplo la certificación ISO 9001 y dentro de sus requisitos se encuentra que los productos deben tener metodologías de análisis validadas.

Los métodos de análisis utilizados en el control de calidad de productos farmacéuticos que no se traten de métodos oficiales de análisis (registrados o contemplados en farmacopea), deben validarse previamente a su uso de rutina y tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para llevar a cabo un análisis determinado.<sup>(1)</sup>

Con la cromatografía líquida de alta resolución que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales se pretende mejorar la eficacia de la técnica analítica obteniendo tiempos de análisis rápidos, separación de sustancias de mezclas complejas con alta resolución, ejecución de análisis con facilidad y exactitud, obteniendo errores relativos menores al 1%. Además el beneficio de la tecnología al brindar un sistema automatizado que inyecta la muestra, realiza la separación, imprime la identificación de cada pico y su concentración para luego repetir el ciclo con la muestra siguiente.<sup>(2)</sup>

Este estudio procedió a validar el método para cuantificar Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromohidrato, y Fenilefrina Clorhidrato (Jarabe A) y también Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromohidrato y Guaifenesina (Jarabe B), producidos en una industria farmacéutica para garantizar que el método de análisis utilizado es confiable y preciso.

La formulación de los jarabes combina estos principios activos por su actividad terapéutica y compatibilidad química para actuar en pacientes con trastornos de tos, gripe, resfriados o alergias. El método de cromatografía de alta resolución logra el análisis de estos principios activos con eficacia al lograr identificarlos y separarlos en una mezcla.

Los resultados fueron examinados con un programa de informática certificado que integra los criterios de estadística y aceptación que especifica cada requisito, que permite generar resultados verídicos para asegurar y validar un método analítico de medicamentos que puede ser aprobado y autorizado.

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1 MALEATO DE CLORFENIRAMINA

**3.1.1 Usos.** El Maleato de Clorfeniramina es un antihistamínico que probablemente sea eficaz en la rinitis alérgica y vasomotora, en la conjuntivitis alérgica, en la urticaria y el angioedema leve, en reacciones alérgicas a la sangre y el plasma en pacientes sensibles, en el dermatografismo y como tratamiento auxiliar del shock anafiláctico. Se utiliza como ingrediente de fórmulas antitusígenas de marca registrada. <sup>(3)</sup>

**3.1.2 Indicaciones.** Tratamiento de diversas reacciones de hipersensibilidad, rinitis, eritema cutáneo y prurito. <sup>(4)</sup>

#### 3.1.3 Propiedades físico-químicas.

- *Estado físico:* polvo
- *Apariencia:* blanco, cristalino
- *Olor:* inodoro
- *pH:* 4 - 5 (de una solución al 1%)
- *pKa:* 9.1
- *Punto de fusión:* 130-135 °C
- *Solubilidad:* 0.25g/mL(agua), 0.1g/mL(alcohol), 0.1g/mL(cloroformo); ligeramente soluble en éter o benceno
- *Fórmula molecular:*  $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$
- *Peso molecular:* 390.87 g/mol <sup>(5)</sup>

### 3.2 BROMOHIDRATO DE DEXTROMETORFANO

**3.2.1 Usos.** El Dextrometorfano, el *d*-isómero del análogo codeínico del levorfanol, se emplea como antitusígeno. Controla los espasmos de tos al deprimir el centro de la tos en el bulbo. Posee una potencia supresora de la tos de aproximadamente la mitad de la potencia antitusígena de la codeína. La

administración oral de 30 mg a un adulto proporciona una actividad antitusiva efectiva en un período de 8 a 12 horas.

A diferencia de la codeína, no posee propiedades analgésicas y produce poca o ninguna depresión del sistema nervioso central.

El Dextrometorfano se combina a menudo con expectorantes u otras drogas en medicaciones de venta libre para la tos y el resfrío. <sup>(3)</sup>

**3.2.2 Indicaciones.** Tratamiento para la supresión de la tos no productiva (crónica). <sup>(4)</sup>

### **3.2.3 Propiedades físico-químicas.**

- *Estado físico:* cristales o polvo
- *Apariencia:* casi blanco o cristalino
- *Olor:* débil
- *pH:* 5.2 - 6.5 (solución de 1 en 1000)
- *Punto de fusión:* 126 °C
- *Temperatura de descomposición:* 126 °C
- *Solubilidad:* 1g en alrededor de 65 mL de agua; completamente soluble en alcohol o cloroformo; insoluble en éter.
- *Fórmula molecular:*  $C_{18}H_{25}NO \cdot HBr$
- *Peso molecular:* 352.32 g/mol <sup>(5)</sup>

## **3.3 GUAIFENESINA**

**3.3.1 Usos.** Se usa para el alivio sintomático de los trastornos respiratorios caracterizados por una tos seca no productiva, y por la presencia de moco en el tracto respiratorio. La acción de la Guaifenesina mejora la tos seca no productiva al disminuir la viscosidad del esputo, la dificultad en la expectoración y aumentar el volumen del esputo. Es un componente en muchas formulaciones expectorantes registradas. <sup>(3)</sup>

**3.3.2 Indicaciones.** Es un expectorante. Se usa para aliviar la congestión y la mucosidad para ayudar a respirar más fácil. La Guaifenesina diluye la mucosidad, aumenta la lubricación de las vías respiratorias (los pulmones, la nariz, y la garganta), y aumenta la eliminación de mucosidad. <sup>(6)</sup>

### **3.3.3 Propiedades físico-químicas.**

- *Estado físico:* polvo cristalino
- *Apariencia:* blanco a levemente gris
- *Olor:* leve, característico
- *Sabor:* amargo
- *pH:* 5 - 7 (solución de 1 en 100)
- *Punto de fusión:* con un intervalo de 3° entre 78 y 82 °C
- *Temperatura de descomposición:* 126 °C
- *Solubilidad:* 1g en 60 a 70 mL de agua; soluble en alcohol, cloroformo, glicerina o propilenglicol; insoluble en éter de petróleo
- *Fórmula molecular:* C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>
- *Peso molecular:* 198.22 g/mol <sup>(5)</sup>

## **3.4 FENILEFRINA**

**3.4.1 Usos.** La Fenilefrina es una amina simpaticomimética que se utiliza por vía intranasal para combatir la congestión nasal y por vía oral en combinación con otros fármacos en el tratamiento de la gripe, resfriados, etc. Aplicada tópicamente sobre los ojos, produce midriasis, siendo utilizada con fines de diagnóstico en el examen del fondo de ojo. <sup>(7)</sup> También en combinación con broncodilatadores administrados por inhalación. <sup>(3)</sup>

**3.4.2 Indicaciones.** La Fenilefrina parenteral está indicada para el mantenimiento de una presión arterial adecuada durante la anestesia general o espinal y para el tratamiento de una hipotensión grave debida a un shock, fármacos o estados de hipersensibilidad. También se emplea en casos de taquicardia supraventricular paroxística y, en la anestesia regional como vasoconstrictor local. <sup>(7)</sup>

### 3.4.3 Propiedades físico-químicas.

- *Estado físico:* polvo
- *Apariencia:* blanco
- *Punto de congelación:* 143.00 - 145.00 °C
- *Fórmula molecular:* C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>.HCl
- *Peso molecular:* 203.67 g/mol<sup>(8)</sup>

## 3.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

### 3.5.1 Fundamentos de la técnica

La cromatografía líquida de alta resolución es actualmente la técnica de separación más ampliamente utilizada debido a su versatilidad y amplio campo de aplicación. Los componentes de la muestra, previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil), son forzados a atravesar la columna cromatográfica gracias a la aplicación de altas presiones. El material interno de la columna, fase estacionaria, está constituido por un relleno capaz de retener de forma selectiva los componentes de la mezcla. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas de disolventes y distintos tipo de relleno. Como resultado final los componentes de la mezcla salen de la columna separados en función de sus tiempos de retención en lo que constituye el cromatograma. A través del cromatograma se puede realizar la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas.

### 3.5.2 Aplicaciones

El campo de aplicación de esta técnica es muy extenso. Algunas de las aplicaciones se nombran a continuación:

- Productos farmacéuticos: antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos
- Bioquímica: aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
- Alimentación: edulcorantes artificiales, antioxidantes, aditivos



- Contaminantes: plaguicidas, herbicidas, fenoles, PCBs
- Química forense: drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
- Medicina clínica: ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, estrógenos.

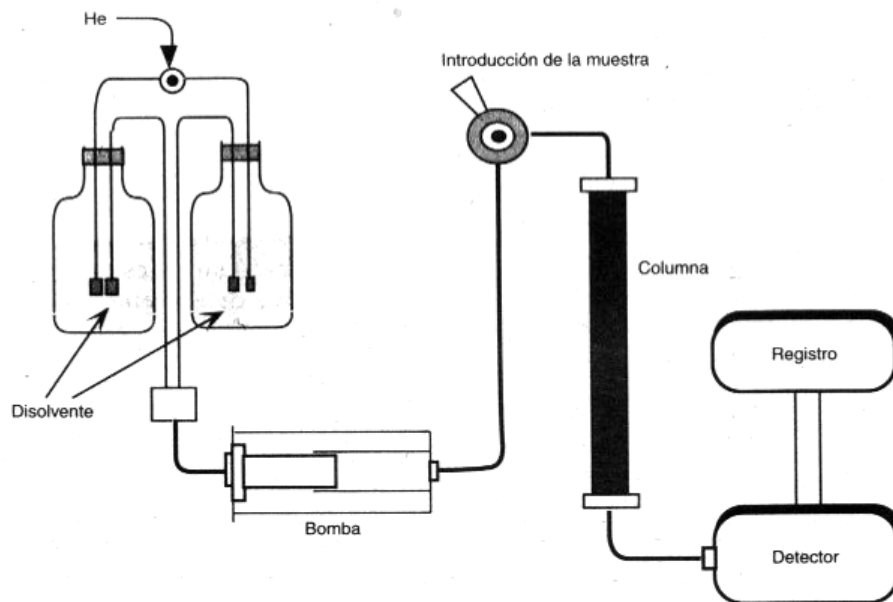
### **3.5.3 Requisitos y limitaciones**

- Las muestras se proporcionarán debidamente filtradas.
- La cantidad mínima para realizar el ensayo es de 0.5 mL.
- Con la entrega de la muestra se entregarán los patrones preparados en las mismas condiciones que esta.
- El rango de volumen de inyección que cubre el equipo es de 10 a 100  $\mu\text{L}$ .<sup>(9)</sup>

### **3.5.4 Instrumentación**

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- A) Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- C) Sistema de inyección de muestras
- D) Columna cromatográfica
- E) Termostatos para las columnas
- F) Detectores
- G) Sistema para el tratamiento de datos y registrador



Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable (Hernández L. 2002).

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio.

Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente (Harris, D. 2001).

- A. Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil (Loro J. F. 2001).

B. Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna.

Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características:

- Generar presiones superiores a 6000 psi.
- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 mL/min con una precisión del 0,5% y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

***Bombas recíprocas o de vaivén***, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, consiguiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno (Skoog, D. A. et al. 2001).

***Bombas neumáticas o de presión constante***, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas. (Hernández, L. 2002).

***Bombas de desplazamiento o tipo jeringa***, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran

un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 mL. (Loro J. F. 2001)

C. Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos:

El método más simple es la utilización de una *jeringa de alta presión* con un diafragma (“septum”) a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi.

Las *válvulas de inyección* con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado.

D. En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación (Loro J. F. 2001).

El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10  $\mu\text{m}$ .

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible (Harris, D. 2001).

E. No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna.

F. El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. (Hernández, L. 2002)

El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles, los cuales son:

- Detectores de absorbanza ultravioleta, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbanza se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.
- Detectores de fluorescencia, son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste.(Loro J. F. 2001)

- Detectores electroquímicos, ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:

- Detectores de índice de refracción, está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula (Harris, D. C. 2001). El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elución con gradiente.
- Detectores de conductividad, son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración. <sup>(9)</sup>

**VENTAJA:**

- Sensibilidad de la técnica.
- Fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas.
- Idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.
- Gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.<sup>(10)</sup>

**DESVENTAJA:**

- Por las presiones altas que se manejan en HPLC, el equipo necesario tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía.
- El solvente se debe filtrar a través de una membrana o microport antes de utilizar.
- Utilizar solventes de grados HPLC o de alta pureza lo que eleva los costos.
- El detector de fluorescencia es limitado por ciertas sustancias ya que no todas las sustancias fluorescen.

**3.6 VALIDACIÓN**

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos adecuados de exactitud y confiabilidad para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo.

En el caso de métodos farmacopeicos, puede resultar necesaria una nueva validación en las siguientes circunstancias: presentación a la USP de un método analítico revisado o utilización de un método general establecido con un nuevo producto o materia prima.

Los documentos de la Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH) aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.  
(11)

Cualquier método de análisis requiere su validación. El método descrito debe incluir los principios en los que se basa y las referencias bibliográficas correspondientes, las especificaciones de los instrumentos y del equipo, los requisitos del material a analizar, incluidas las condiciones de almacenamiento, los diferentes reactivos, su procedencia comercial y el grado de pureza, su preparación y sus concentraciones expresadas en las unidades adecuadas, la descripción detallada de todos los pasos (especialmente de los críticos), cualquier precaución acerca de la seguridad en la manipulación de las muestras, la eliminación de los residuos, el procedimiento de calibración de los instrumentos, el cálculo de los resultados, las descripciones de los compuestos de referencia (estándar) y el intervalo analítico (intervalo de concentraciones de los compuestos en la muestra para el que puede aplicarse el método sin modificación).

En la elección de métodos de análisis, los estudios de estabilidad requieren detectar pequeños cambios que pueden ser significativos a lo largo del tiempo de almacenamiento. La cromatografía de gases (CG) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los métodos espectrométricos, las valoraciones gravimétricas, volumétricas y electroquímicas, son capaces de tal precisión.

El control de calidad del producto final (para su comercialización) requiere la especificación muy estrecha de los límites de pureza y concentración, para lo



que se usan la cromatografía líquida de alta resolución HPLC o la cromatografía de gases CG, por su sencillez, velocidad, buena especificidad y excelente precisión.<sup>(12)</sup>

### **3.7 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO**

Para asegurar la calidad de los resultados en un proceso de validación se requiere del cumplimiento de ciertas características de laboratorio que satisfacen los requerimientos de la aplicación deseada.

#### **3.7.1 EXACTITUD**

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método, y el valor verdadero.

La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo.

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un estándar de referencia), o comparando los resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del método.

#### **3.7.2 PRECISIÓN**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión es una medida del grado

de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

### **3.7.3 ESPECIFICIDAD**

Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios.

En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

### **3.7.4 LÍMITE DE DETECCIÓN**

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad

de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales.

### **3.7.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la misma cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Para métodos no instrumentales, el límite cuantitativo se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales.

### **3.7.6 LINEALIDAD E INTERVALO**

La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por

medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras en un intervalo dado.

El intervalo de un método analítico es la amplitud entre la concentración inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el método analítico.

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si aparece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos).

### **3.7.7 TOLERANCIA, TAMBIÉN CONOCIDA COMO FORTALEZA O RESISTENCIA**

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados de las pruebas obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones, como por ejemplo en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, instrumentos, lotes de reactivos, tiempo transcurrido durante la valoración, temperaturas de valoración o días. La tolerancia se expresa normalmente como la carencia de influencia de las variables operativas y ambientales del método analítico sobre los resultados de las pruebas. La tolerancia es una medida de la reproducibilidad de los resultados de las pruebas sometidas a la variación de condiciones que se esperarían normalmente entre distintos laboratorios o distintos analistas.

La tolerancia de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, utilizando condiciones operativas y ambientales que pueden ser diferentes pero que continúan encontrándose dentro de los parámetros especificados del análisis.

### **3.7.8 ROBUSTEZ**

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método; además proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

### **3.7.9 APTITUD DEL SISTEMA**

Si las mediciones son susceptibles a variaciones en condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o incluirse en el método una declaración preventiva. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez sería el establecimiento de una serie de parámetros de aptitud del sistema que garantizan que se mantenga la validez del método analítico siempre que se utilice. Las variaciones típicas son la estabilidad de las soluciones y equipo analítico, y de los analistas. En la cromatografía líquida, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. <sup>(12,13)</sup>

Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un método específico dependen del tipo de método que se está evaluando. <sup>(11)</sup>

Las farmacopeas no describen un método analítico que pueda cuantificar en un sólo ensayo los cuatro principios activos contenidos en los jarabes a ensayar y por eso se presenta este método como una alternativa al análisis descrito en las farmacopeas. En la farmacopea Británica se encuentran las monografías de la materia prima Dextrometorfano Bromohidrato y de Guaifenesina, siendo el método de cuantificación por titulación. En la farmacopea Mexicana están las monografías de Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromohidrato y Fenilefrina Clorhidrato pero los ensayos también son por titulación. La farmacopea Estadounidense reporta las monografías de las materias primas de Clorfeniramina Maleato y Fenilefrina Clorhidrato por titulación, el Dextrometorfano Bromohidrato y Guaifenesina se ensayan por métodos diferentes en cromatografía líquida de alta resolución. Únicamente en la farmacopea Estadounidense se encontró una monografía para la cuantificación de Guaifenesina, Pseudoefedrina, Acetaminofén y Dextrometorfano Bromohidrato en soluciones orales, pero el ensayo se realiza por diferentes metodologías de análisis en HPLC.

En la actualidad se efectuó una revisión bibliográfica sobre los trabajos de tesis para optar la licenciatura de Químico Farmacéutico de la Universidad de San Carlos de Guatemala y de la Universidad del Valle de Guatemala, para verificar si existía alguna específica en la validación de la metodología analítica de estos principios activos en la forma farmacéutica analizada.

En junio 2006, Herberth Raúl Arévalo Alvarado trabajó una validación retrospectiva de proceso de manufactura y método de análisis de cápsulas de Diclofenaco Sódico 50 mg.<sup>(14)</sup> Con esto se estableció que la validación retrospectiva es aplicable para métodos o procesos repetidamente utilizados, que no han sido validados anteriormente y de los que se tiene

documentación suficiente para probar el funcionamiento, tanto del proceso de manufactura como del método de análisis. Además de esto, es utilizado para cualquier forma farmacéutica sólida, media vez se tenga los datos suficientes para que dicha validación tenga significancia estadística.

En julio 2003, Mario René Pinzón Meza llevó a cabo un estudio de implementación de metodología para Acido Valproico por cromatografía líquida de alta resolución y validación por cromatografía de gases con detector selectivo de masas en muestras séricas.<sup>(15)</sup> El método validado para la determinación de Acido Valproico por cromatografía de gases con detector selectivo de masas es eficaz, rápido y confiable, permite resultados rápidos, los que por su carácter de validación son de completa confianza al cumplir con los parámetros de establecidos por la USP XXIV aplicables a muestras biológicas.

En mayo de 2002, Rossana Anleu Lainfiesta realizó una investigación para validar un método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de Ibuprofeno en suspensión.<sup>(1)</sup> El método demostró ser selectivo para Ibuprofeno ya que separa esta sustancia del resto de ingredientes en la formulación; y es válido porque puede utilizarse como un método analítico, es decir, que cumple con las características necesarias para poder cuantificar Ibuprofeno en la forma farmacéutica de suspensión.

En noviembre de 2002, Anabelly Carolina Franco Flores elaboró una guía para validar métodos analíticos nuevos o modificados para productos farmacéuticos.<sup>(16)</sup> Se determinó que para validar un método analítico, es indispensable disponer de un diseño experimental apropiado, establecer límites expresados en términos cuantificables, y un tratamiento estadístico adecuado de los datos obtenidos experimentalmente. Así mismo, se debe tener en claro las características y requerimientos que debe satisfacer el

método analítico a validar, que garantiza el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis para su aplicación rutinaria y la seguridad en obtener un rendimiento aceptable.

En enero 1998, Sandra Patricia de León Barrientos efectuó un estudio sobre validación del método de cromatografía líquida de alta resolución para cuantificación de vitamina A en tabletas masticables.<sup>(17)</sup> Se comprobó que el método propuesto es capaz de diferenciar Vitamina A de cualquier otra sustancia, ya sea activo o placebo, presente en la formulación utilizada de dicho trabajo de tesis. En sí, el sistema es capaz de detectar niveles de Vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables que van desde 912.5 UI hasta 5475.0 UI.



## 4. JUSTIFICACIÓN

El tiempo del proceso de fabricación de un producto farmacéutico es notablemente afectado por el tiempo utilizado en la elaboración de sus respectivos análisis físicos, químicos y microbiológicos, mismos que deben realizarse para garantizar la calidad del producto. Por lo que es importante contar con metodologías de análisis rápidos, precisos y confiables.

La precisión y exactitud de un método es determinado mediante el cumplimiento de los parámetros de validación (linealidad, exactitud, precisión intermedia, especificidad, etc.). Es por ello que surge la necesidad de brindar una metodología validada y rápida para la cuantificación de maleato de clorfeniramina, bromohidrato de dextrometorfano, guaifenesina y fenilefrina clorhidrato, realizándose ésta por cromatografía líquida de alta resolución ya que esta técnica brinda una mejor separación de los activos de posibles componentes interferentes (excipientes).

Estos medicamentos por su actividad antitusígena son combinados para potenciar la acción terapéutica que beneficiará adultos y niños; así mismo, sus propiedades fisicoquímicas permiten elaborar un producto farmacológico, homogéneo y de fácil adquisición.

Los estudios recientes muestran que no hay un método analítico que involucre la asociación de cuatro principios activos. Debido a esto surgió la necesidad de realizar un estudio de validación para la cuantificación de maleato de clorfeniramina, bromohidrato de dextrometorfano, guaifenesina y fenilefrina clorhidrato, dos jarabes en un sólo método analítico.

## 5. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que cumpla con los requerimientos y normas ICH y Farmacopea Estadounidense (USP 2006) para la cuantificación de cuatro principios activos contenidos en dos medicamentos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Diseñar un método de análisis selectivo para la cuantificación de Maleato de Clorfeniramina, Bromohidrato de Dextrometorfano, Guaifenesina y Fenilefrina Clorhidrato utilizando cromatografía líquida de alta resolución.

4.2.2 Determinar y demostrar que la metodología propuesta cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia y especificidad según lo establece la Farmacopea Estadounidense (USP) y normas de Validation of Analytical procedures ICH.

4.2.4 Proveer una metodología validada que sirva como guía a la industria farmacéutica para la cuantificación de estos principios activos, tomando en cuenta que si es utilizada en otros productos debe de ser ensayada y validada nuevamente.

## 6. HIPÓTESIS

El método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromohidrato, guaifenesina y fenilefrina clorhidrato en los jarabes sometidos al análisis, cumple con los parámetros de validación establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos versión en español USP 30 y normas ICH Q2B (Internacional Conference on Harmonised), por lo que proporciona datos precisos, reproducibles y confiables.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Muestras de dos jarabes comerciales.

- Jarabe A composición teórica.

Clorfeniramina Maleato..... 1 mg/5mL

Dextrometorfano Bromohidrato.....5 mg/5mL

Fenilefrina Clorhidrato.....2.5 mg/mL

- Jarabe B composición teórica

Guaifenesina.....100 mg/5mL

Clorfeniramina Maleato..... 2 mg/5mL

Dextrometorfano Bromohidrato.....10 mg/5mL

### 7.2 MEDIOS

#### 7.2.1 Recursos Humanos

- Autora: Frida Lucitania Vallejo García
- Asesora: Lcda. Ibe Arleth Arriola Díaz
- Co-Asesor: Lic. Francisco Estuardo Serrano Vives
- Revisora: Lcda. Alma Lucrecia Martínez Cano
- Colaboradora: Lcda. Viviana Lisbeth Sandoval Lutín
- Personal profesional y técnico del Laboratorio Transnacional del Departamento de Investigación y Desarrollo

#### 7.2.2 Materiales

- Libros
- Folletos
- Información por Internet
- Cámara digital
- Memoria USB

- Papel bond para impresora
- Papel pH
- Filtros Wathman

### **7.2.3 Instalaciones**

- Laboratorio transnacional
- Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala
- Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala
- Centro Guatemalteco de Información de Medicamentos –CEGIMED-
- Centro de Documentación/Biblioteca de Farmacia –CEDOBF-

## **7.3 RECURSOS MATERIALES**

### **7.3.1 Equipo**

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Jeringa de 50  $\mu$ L
- Columna Whatman Partisil SCX
- Balanza analítica
- Espátula
- Bomba al vacío
- Estufa con calentador y agitador
- Magnetos
- Baño de María
- Baño de ultrasonido
- Potenciómetro
- Computadora
- Impresora

### 7.3.2 Datos de la calibración de equipos

- Descripción del equipo: Cromatógrafo líquido de alta resolución, marca Merck Hitachi Serie d-7000 con detector UV-VIS y automuestreador, código ID-EE-056.
  - Fecha de calibración: 22 de septiembre del 2006.
  - Frecuencia de calibración: Cada 4 meses.
  - Empresa y persona que lo calibró: Ing. Daniel Pérez de MERCK. \*
  - Descripción del equipo: Balanza analítica marca Mettler Toledo AG 204, código ID-EE-052.
  - Fecha de calibración: 20 de junio del 2006.
  - Empresa y persona que lo calibró: Sr. Jacobo Chum de PRESICIÓN.
  - Frecuencia de calibración: Cada 6 meses. \*
- \* (Ver copia de los certificados de calibración en Anexos)

### 7.3.3 Reactivos

- Agua HPLC
- Metanol HPLC
- Fosfato Monobásico de Potasio
- Ácido fosfórico al 50%

### 7.3.4 Cristalería

- Balones volumétricos de 25, 50, 100, 1,000 y 2,000 mL
- Pipeta volumétrica de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 mL
- Beakers de 50, 100, 1,000 y 2,000 mL
- Embudos
- Kitazato y equipo de filtración
- Varilla de vidrio
- Probetas de 100 mL
- Viales
- Micropipetas

## 7.4 METODOLOGÍA

### 7.4.1 CUANTIFICACIÓN DE GUAIFENESINA

La cuantificación de Guaifenesina se llevó a cabo mediante el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual posee los siguientes procedimientos:

#### 7.4.1.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Fase Móvil: En un recipiente adecuado se colocó 600 mL de metanol HPLC agregando 400 mL de buffer de fosfatos pH 4 para mezclar y filtrar a través de una membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  que permitió desgasificar.
- Ácido Fosfórico al 20%: Se midió 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL que contenía 50 mL de agua desmineralizada que se llevó a volumen con el mismo solvente.
- Buffer de Fosfatos: Se pesó 3.4 g de fosfato monobásico de potasio, disolviéndolos en 450 mL de agua para ajustar a pH 4 con ácido fosfórico al 20% (1 a 5 gotas) llevando a volumen de 500 mL.
- Solución de Dilución: Se preparó una solución con 40% de agua y 60% de metanol HPLC que se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  para desgasificar.

#### 7.4.1.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN:

Se pesaron 200 mg de Guaifenesina que se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Posteriormente se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL para llevar a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Guaifenesina 0.4 mg/mL.

#### 7.4.1.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Para preparar la muestra se pesó 200 mg de materia prima y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, después sonificar llevando a volumen con la misma solución y finalmente mezclar. En seguida se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL llevando a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Guaifenesina 0.4 mg/mL.

#### 7.4.1.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Aparato: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución  
 Columna: Whatman 10 SCX (Con grupos arilsulfónicos)  
 Longitud de onda: 220 nm  
 Volumen de inyección: 20 µL  
 Flujo de la fase móvil: 1.0 mL/min.  
 Fase Móvil: Metanol HPLC: Buffer de fosfatos pH 4 (600:400)

#### 7.4.1.5 PROCEDIMIENTO:

Se inyectó la solución patrón y por duplicado la muestra de Guaifenesina según el procedimiento del punto 7.4.1.3

#### 7.4.1.6 CÁLCULOS:

Para encontrar la concentración de Guaifenesina se calculó la cantidad en % de Guaifenesina por cada 5 mL, mediante la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{Am}{Ap} \times Cp \times P \times \frac{Dil}{Pm} \times 100$$



Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Guaifenesina

$P$  = Pureza del patrón (%100)

$Dil$  = Diluciones de la muestra

$P_m$  = Peso de la muestra

100 = Factor para reportar en %

#### **7.4.2 CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO**

La cuantificación de Clorfeniramina Maleato se llevó a cabo mediante el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual posee los siguientes procedimientos:

##### **7.4.2.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:**

- Fase Móvil: En un recipiente adecuado se colocó 600 mL de metanol HPLC agregando 400 mL de buffer de fosfatos pH 4 para mezclar y filtrar a través de una membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  que permitió desgasificar.
- Ácido Fosfórico al 20%: Se midió 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL que contenían 50 mL de agua desmineralizada que se llevó a volumen con el mismo solvente.
- Buffer de Fosfatos: Se pesó 3.4 g de fosfato monobásico de potasio, disolviéndolos en 450 mL de agua y ajustar a pH 4 con ácido fosfórico al 20% (1 a 5 gotas) llevando a volumen de 500 mL.

- Solución de Dilución: Se preparó una solución que contenga 40% agua y 60% de metanol HPLC que se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  para desgasificar.

#### 7.4.2.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN:

Se pesaron 8 mg de Clorfeniramina Maleato que se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Posteriormente se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL para llevar a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Clorfeniramina Maleato 0.08 mg/mL.

#### 7.4.2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para preparar la muestra se pesó 8 mg de materia prima y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, después sonificar llevando a volumen con la misma solución y finalmente mezclar. En seguida se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL llevando a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Clorfeniramina Maleato 0.08 mg/mL

#### 7.4.2.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Aparato: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución

Columna: Whatman 10 SCX  
(Con grupos arilsulfónicos)

Longitud de onda: 220 nm

Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$

Flujo de la fase móvil: 1.0 mL/min.

Fase Móvil: Metanol HPLC: buffer de fosfatos pH 4 (600:400)

#### 7.4.2.5 PROCEDIMIENTO:

Se inyectó la solución patrón y por duplicado la muestra de Clorfeniramina Maleato según procedimiento del punto 7.4.2.3

#### 7.4.2.6 CÁLCULOS:

Para encontrar la concentración de Clorfeniramina Maleato se calculó la cantidad en % de Clorfeniramina Maleato, mediante la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{Am}{Ap} \times Cp \times P \times \frac{Dil}{Pm} \times 100$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Clorfeniramina Maleato

$P$  = Pureza del patrón (%100)

$Dil$  = Diluciones de la muestra

$P_m$  = Peso de la muestra

100 = Factor para reportar en %

### 7.4.3 CUANTIFICACIÓN DE FENILEFRINA CLORHIDRATO

La cuantificación de Fenilefrina Clorhidrato se llevó a cabo mediante el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual posee los siguientes procedimientos:

#### 7.4.3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Fase Móvil: En un recipiente adecuado se colocó 600 mL de metanol HPLC agregando 400 mL de buffer de fosfatos pH 4 para mezclar y filtrar a través de una membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  que permitió desgasificar.
- Ácido Fosfórico al 20%: Se midió 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL que contenía 50 mL de agua desmineralizada que se llevó a volumen con el mismo solvente.
- Buffer de Fosfatos: Se pesó 3.4 g de fosfato monobásico de potasio, disolviéndolos en 450 mL de agua y ajustar a pH 4 con ácido fosfórico al 20% (1 a 5 gotas) llevando a volumen de 500 mL.
- Solución de Dilución: Se preparó una solución que contenga 40% agua y 60% de metanol HPLC que se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  para desgasificar.

#### 7.4.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN:

Se pesaron 20 mg de Fenilefrina Clorhidrato que se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Posteriormente se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL para llevar a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Fenilefrina Clorhidrato 0.04 mg/mL

#### 7.4.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Para preparar la muestra se pesó 20 mg de materia prima y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con

solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y finalmente mezclar. Enseguida se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL llevando a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Fenilefrina Clorhidrato 0.04 mg/mL

#### 7.4.3.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Aparato: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución  
 Columna: Whatman 10 SCX (Con grupos arilsulfónicos)  
 Longitud de onda: 220 nm  
 Volumen de inyección: 20 µL  
 Flujo de la fase móvil: 1.0 mL/min.  
 Fase Móvil: Metanol HPLC: Buffer de fosfatos pH 4 (600:400)

#### 7.4.3.5 PROCEDIMIENTO:

Se inyectó la solución patrón y por duplicado la muestra de Fenilefrina Clorhidrato según procedimiento del punto 7.4.3.3

#### 7.4.3.6 CÁLCULOS:

Para encontrar la concentración de Fenilefrina Clorhidrato se calculó la cantidad en % de Fenilefrina Clorhidrato, mediante la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times P \times \frac{Dil}{Pm} \times 5$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

Cp = Concentración del patrón en mg/mL de Fenilefrina  
Clorhidrato

P = Pureza del patrón (%100)

Dil = Diluciones de la muestra

Pm = Peso de la muestra

100 = Factor para reportar en %

#### **7.4.4 CUANTIFICACIÓN DE DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO**

La cuantificación de Dextrometorfano Bromhidrato se llevó a cabo mediante el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual posee los siguientes procedimientos:

##### **7.4.4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:**

- Fase Móvil: En un recipiente adecuado se colocó 600 mL de metanol HPLC agregando 400 mL de buffer de fosfatos pH 4 para mezclar y filtrar a través de una membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  que permitió desgasificar.
- Ácido Fosfórico al 20%: Se midió 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL que contenía 50 mL de agua desmineralizada que se llevó a volumen con el mismo solvente.
- Buffer de Fosfatos: Se pesó 3.4 g de fosfato monobásico de potasio, disolviéndolos en 450 mL de agua y ajustar a pH 4 con ácido fosfórico al 20% (1 a 5 gotas) llevando a volumen de 500 mL.
- Solución de Dilución: Se preparó una solución que contenga 40% agua y 60% de metanol HPLC que se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  para desgasificar.

#### 7.4.4.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN:

Se pesaron 40 mg de Dextrometorfano Bromhidrato que se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Posteriormente se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL para llevar a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Dextrometorfano Bromhidrato 0.08 mg/mL.

#### 7.4.4.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Para preparar la muestra se pesó 40 mg de Dextrometorfano Bromhidrato, y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y finalmente mezclar. Enseguida se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL llevando a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Dextrometorfano Bromhidrato 0.08 mg/mL.

#### 7.4.4.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Aparato: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución  
Columna: Whatman 10 SCX (Con grupos arilsulfónicos)  
Longitud de onda: 220 nm  
Volumen de inyección: 20 µL  
Flujo de la fase móvil: 1.0 mL/min.  
Fase Móvil: Metanol HPLC: Buffer de fosfatos pH 4 (600:400)

#### 7.4.4.5 PROCEDIMIENTO:

Se inyectó la solución patrón y por duplicado la muestra de Dextrometorfano Bromhidrato según procedimiento del punto 7.4.4.3

#### 7.4.4.6 CÁLCULOS:

Para encontrar la concentración de Dextrometorfano Bromhidrato se calculó la cantidad en % de Dextrometorfano Bromhidrato, mediante la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{Am}{Ap} \times Cp \times P \times \frac{Dil}{Pm} \times 100$$

Donde:

Am = Área obtenida en la solución muestra

Ap = Área obtenida en la solución patrón

Cp = Concentración del patrón en mg/mL de Dextrometorfano Bromhidrato

P = Pureza del patrón (%100)

Dil = Diluciones de la muestra

Pm = Peso de la muestra

100 = Factor para reportar en %

### 7.4.5 CUANTIFICACIÓN DE FENILEFRINA, DEXTROMETORFANO Y CLORFENIRAMINA EN JARABE A

La cuantificación de Fenilefrina, Dextrometorfano y Clorfeniramina en Jarabe A se llevó a cabo mediante el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual posee los siguientes procedimientos:



#### 7.4.5.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Fase Móvil: En un recipiente adecuado se colocó 600 mL de metanol HPLC agregando 400 mL de buffer de fosfatos pH 4 para mezclar y filtrar a través de una membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  que permitió desgasificar.
- Ácido Fosfórico al 20%: Se midió 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL que contenía 50 mL de agua desmineralizada que se llevó a volumen con el mismo solvente.
- Buffer de Fosfatos: Se pesó 3.4 g de fosfato monobásico de potasio, disolviéndolos en 450 mL de agua y ajustar a pH 4 con ácido fosfórico al 20% (1 a 5 gotas) llevando a volumen de 500 mL.
- Solución de Dilución: Se preparó una solución que contenga 40% agua y 60% de metanol HPLC que se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  para desgasificar.

#### 7.4.5.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN:

Se pesaron 20 mg de Fenilefrina Clorhidrato, 40 mg de Dextrometorfano Bromhidrato y 8 mg de Clorfeniramina Maleato que se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Posteriormente se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL para llevar a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Fenilefrina Clorhidrato 0.04 mg/mL, Dextrometorfano Bromhidrato 0.08 mg/mL, Clorfeniramina Maleato 0.016 mg/mL.

#### 7.4.5.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Para preparar la muestra se transfirieron 2 mL de Jarabe A a un balón volumétrico de 25 mL diluyendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Enseguida se filtró a través de un filtro Whatman No1.

La concentración final aproximada es de: Fenilefrina Clorhidrato 0.04 mg/mL, Dextrometorfano Bromhidrato 0.08 mg/mL y Clorfeniramina Maleato 0.016 mg/mL.

#### 7.4.5.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Aparato: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución

Columna: Whatman 10 SCX (Con grupos arilsulfónicos)

Longitud de onda: 220 nm

Volumen de inyección: 20 µL

Flujo de la fase móvil: 1.0 mL/min.

Fase Móvil: Metanol HPLC: Buffer de fosfatos pH 4 (600:400)

#### 7.4.5.5 PROCEDIMIENTO:

Se inyectó la solución patrón y por duplicado la muestra de Jarabe A según procedimiento del punto 7.4.5.3

#### 7.4.5.6 CÁLCULOS:

Para encontrar la concentración de Dextrometorfano Bromhidrato se calculó la cantidad en mg de Dextrometorfano por cada 5 mL, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de Dextrometorfano}}{5\text{mL}} = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times P \times \frac{Dil}{V_m} \times 5$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Dextrometorfano  
Bromhidrato

$P$  = Pureza del patrón (%100)

$Dil$  = Diluciones de la muestra

$V_m$  = Volumen medido de la muestra en mL.

$5$  = Factor para reportar en mg/5mL.

Para encontrar la concentración de Clorfeniramina Maleato se calculó la cantidad en mg de Clorfeniramina Maleato por cada 5 mL, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de Clorfeniramina}}{5\text{mL}} = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times P \times \frac{Dil}{V_m} \times 5$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Clorfeniramina  
Maleato.

$P$  = Pureza del patrón (%100)

$Dil$  = Diluciones de la muestra

$V_m$  = Volumen medido de la muestra

$5$  = Factor para reportar en mg/5mL

Para encontrar la concentración de Fenilefrina se calculó la cantidad en mg de Fenilefrina por cada 5 mL, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de Fenilefrin } a}{5\text{mL}} = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times P \times \frac{Dil}{V_m} \times 5$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Fenilefrina.

$P$  = Pureza del patrón

$Dil$  = Diluciones de la muestra

$V_m$  = Volumen medido de la muestra en mL.

5 = Factor para reportar en mg/5mL.

#### 7.4.6 CUANTIFICACIÓN DE GUAIFENESINA, DEXTROMETORFANO Y CLORFENIRAMINA EN JARABE B

La cuantificación de Guaifenesina, Dextrometorfano y Clorfeniramina en Jarabe B se llevó a cabo mediante el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual posee los siguientes procedimientos:

##### 7.4.6.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Fase Móvil: En un recipiente adecuado se colocó 600 mL de metanol HPLC agregando 400 mL de buffer de fosfatos pH 4 para mezclar y filtrar a través de una membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  que permitió desgasificar.
- Ácido Fosfórico al 20%: Se midió 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL que contenía 50 mL de agua desmineralizada que se llevó a volumen con el mismo solvente.

- Buffer de Fosfatos: Se pesó 3.4 g de fosfato monobásico de potasio, disolviéndolos en 450 mL de agua y ajustar a pH 4 con ácido fosfórico al 20% (1 a 5 gotas) llevando a volumen de 500 mL.
- Solución de Dilución: Se preparó una solución que contenga 40% agua y 60% de metanol HPLC que se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  para desgasificar.

#### 7.4.6.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN:

Se pesaron 200 mg de Guaifenesina, 40 mg de Dextrometorfano Bromhidrato y 8 mg de Clorfeniramina Maleato que se transfirieron a un balón volumétrico de 100 mL, disolviendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Posteriormente se transfirieron 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 25 mL para llevar a volumen con la solución de dilución.

La concentración final aproximada es de: Guaifenesina 0.4 mg/mL, Dextrometorfano Bromhidrato 0.08 mg/mL, Clorfeniramina Maleato 0.016 mg/mL.

#### 7.4.6.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para preparar la muestra se transfirieron 2 mL de Jarabe B a un balón volumétrico de 25 mL diluyendo con solución de dilución, sonificar y llevar a volumen con la misma solución y luego mezclar. Enseguida se filtró a través de un filtro Whatman No1.

La concentración final aproximada es de: Guaifenesina 0.4 mg/mL, Dextrometorfano Bromhidrato 0.08 mg/mL y Clorfeniramina Maleato 0.016 mg/mL.

## 7.4.6.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Aparato: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución  
 Columna: Whatman 10 SCX (Con grupos arilsulfónicos)  
 Longitud de onda: 220 nm  
 Volumen de inyección: 20 µL  
 Flujo de la fase móvil: 1.0 ml/min.  
 Fase Móvil: Metanol HPLC: Buffer de fosfatos pH 4 (600:400)

## 7.4.6.5 PROCEDIMIENTO:

Se inyectó la solución patrón y por duplicado la muestra de Jarabe B según procedimiento del punto 7.4.6.3

## 7.4.6.6 CÁLCULOS:

Para encontrar la concentración de Dextrometorfano se calculó la cantidad en mg de Dextrometorfano por cada 5 mL, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de Dextrometorfano}}{5\text{mL}} = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times P \times \frac{\text{Dil}}{V_m} \times 5$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Dextrometorfano Bromhidrato

$P$  = Pureza del patrón (%100)

$\text{Dil}$  = Diluciones de la muestra

$V_m$  = Volumen medido de la muestra en mL

5 = Factor para reportar en mg/5mL

Para encontrar la concentración de Clorfeniramina se calculó la cantidad en mg de Clorfeniramina Maleato por cada 5 mL, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de Clorfeniramina}}{5\text{mL}} = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times P \times \frac{\text{Dil}}{V_m} \times 5$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Clorfeniramina Maleato.

$P$  = Pureza del patrón (%100)

$\text{Dil}$  = Diluciones de la muestra

$V_m$  = Volumen medido de la muestra

$5$  = Factor para reportar en mg/5mL

Para encontrar la concentración de Fenilefrina se calculó la cantidad en mg de Fenilefrina por cada 5 mL, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de Fenilefrina}}{5\text{mL}} = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times P \times \frac{\text{Dil}}{V_m} \times 5$$

Donde:

$A_m$  = Área obtenida en la solución muestra

$A_p$  = Área obtenida en la solución patrón

$C_p$  = Concentración del patrón en mg/mL de Fenilefrina

$P$  = Pureza del patrón

$\text{Dil}$  = Diluciones de la muestra

$V_m$  = Volumen medido de la muestra en mL.

5 = Factor para reportar en mg/5mL.

#### **7.4.7 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA**

Un método de análisis para ser validado debió demostrar información documentada del procedimiento seguido, lo cual debió corresponder a un diseño experimental junto con un procedimiento estadístico apropiado y con evidencias de aceptación de la funcionalidad del método para las aplicaciones analíticas propuestas.

#### **EVALUACIÓN DE LOS PARAMETROS DE DESEMPEÑO**

Para validar una metodología de análisis se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño analítico.

#### **EXACTITUD**

La exactitud se determinó mediante la aplicación del método analítico a una de las siguientes pruebas:

##### Valoración de un principio activo

Se analizaron tres diferentes concentraciones del analito de pureza conocida cada una por triplicado (en base a un estándar de referencia).

#### **VALORACIÓN DE UN PRINCIPIO ACTIVO EN UN PRODUCTO TERMINADO**

##### **Método de acumulación**

Se obtuvieron muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, agregando tres cantidades diferentes y conocidas del analito al producto farmacéutico que corresponden a un lote de fabricación determinado.



Antes de agregar el analito a la muestra fue necesario determinar el contenido promedio del analito en la muestra con el método a validar y luego se procedió a enriquecer las muestras con el estándar.

Los valores del analito sugeridos que se agregaron son del 100, 120 y 140% de la concentración normal de trabajo del método, pero variaban según la prueba de validación que se ensayaba; así mismo el número de datos que se empleaban en cada prueba.

Para realizar los cálculos del porcentaje de recuperación del analito fue necesario restar el promedio de las concentraciones del analito contenidas en las muestras determinadas inicialmente para determinar el valor real utilizado.

## **PRECISIÓN**

La precisión es una medida del grado de repetibilidad o de la reproducibilidad del método analítico en condiciones normales de operación.

### **Repetibilidad**

Esta prueba se realizó analizando la muestra en un mismo laboratorio, bajo las mismas condiciones de operación, por el mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados. Se realizó el siguiente ensayo:

- Se analizó la muestra (materia prima y producto terminado) que en el ensayo fue tomada como el cien por ciento (concentración normal de trabajo del método sometido a validación) un mínimo de seis veces.

### **Precisión intermedia**

Para la realización de esta prueba se analizó la muestra a la concentración tomada como el cien por ciento y se obtuvieron variaciones en las condiciones de análisis de la siguiente manera:

- Un mismo analista, dos días diferentes de análisis, el mismo aparato o instrumento.

- Dos analistas diferentes, en el mismo día de análisis, el mismo aparato o instrumento.

Se evaluaron dos variaciones en las condiciones de análisis y la muestra se analizó un mínimo de seis veces con cada variación.

## **LINEALIDAD E INTERVALO DE LINEALIDAD**

Para este ensayo se realizaron las pruebas de Linealidad del Sistema y Linealidad del Método.

### **Linealidad del Sistema**

Para la linealidad del sistema se preparó una solución patrón (solución madre) y a partir de ésta se realizaron las diluciones necesarias obteniéndose como mínimo cinco diferentes concentraciones (soluciones hijas). La curva de calibración se obtuvo con los resultados de las soluciones hijas, las cuales se analizaron con el mismo método analítico, bajo las mismas condiciones, el mismo aparato o instrumento, el mismo día y el mismo analista. Para la validación de un principio activo (materia prima) o producto terminado se incluyeron las concentraciones del 60% al 140%. Este procedimiento se repitió tres veces.

### **Linealidad del método**

Para la linealidad del método se analizaron las muestras a tres diferentes concentraciones por triplicado, bajo las mismas condiciones de operación, por el mismo analista y en el mismo día.

### **Intervalo de linealidad**

El intervalo de linealidad lo constituyó el rango en el cual se examinó la linealidad.

## **ESPECIFICIDAD**

Para realizar la prueba de especificidad se sometieron la muestra y la solución de mezcla de estándares a diferentes condiciones que dieron origen a la formación de productos de degradación.

La degradación se obtuvo con los siguientes métodos.

- Degradación ácida: a la muestra se le agregaron 10 mL de ácido clorhídrico 1.2N, se calentaron durante 30 minutos, neutralizándose con una solución de NaOH diluido que enseguida se aforó.
- Degradación básica: a la muestra se le agregaron 10 mL de hidróxido de sodio 0.1N, se calentaron durante 30 minutos, se neutralizó con una solución de HCl diluido que enseguida se aforó.
- Degradación con agua oxigenada: a la muestra se le agregaron 10 mL de agua oxigenada de 10 volúmenes, se calentaron durante 30 minutos que después se aforó.
- Degradación con sulfito de sodio: a la muestra se le agregaron 10 mL de sulfito de sodio al 10%, se calentaron durante 30 minutos que después se aforó.

### **7.4.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los resultados obtenidos fueron ingresados en un programa estadístico para las pruebas de validación llamado “Validación de Técnicas Analíticas”, establecido y recomendado por ICH, FDA, USP 25, que permite analizarlos con base en los criterios de aceptación de cada parámetro. <sup>(22)</sup>

## **EXACTITUD**

La exactitud se calculó como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra o como la diferencia entre la medida de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Se registraron los resultados obtenidos y se calculó lo siguiente:

- a) Porcentaje de recuperación
- b) Coeficiente de variación

Los resultados se compararon con los siguientes criterios de aceptación:

- a) Porcentaje de recuperación: %R: 98.00% - 102.00%
- b) Coeficiente de variación: %CV menor o igual a 2.0%

## **PRECISIÓN**

### **Precisión Intermedia**

Se calculó el % de coeficiente de variación, el cual tiene un criterio de aceptación menor o igual al 2%.

### **Repetibilidad**

Se calculó:

- El porcentaje de coeficiente de variación, el cual tiene un criterio de aceptación no mayor al 2%.
- El porcentaje de recuperación, el cual tiene un criterio de aceptación del 98 al 102%.

## **ESPECIFICIDAD**

Se compararon las respuestas obtenidas del producto sin degradar con las respuestas obtenidas con el producto degradado por los diferentes métodos. Los agentes de degradación presentaron otra respuesta obtenida con las muestras no degradadas.

El método de análisis es específico porque los productos de degradación aparecieron en diferentes tiempos de retención en que eluyeron los analitos de interés para la materia prima y el Jarabe A; sin embargo para la Guafenesina en el Jarabe B no era específico este método.

## **LINEALIDAD**

### **Linealidad del sistema**

Se determinó la ecuación de la regresión lineal ( $y = a + bx$ ) calculada por el método de mínimos cuadrados basada en lecturas ( $y$ ) versus concentración ( $x$ ). Se evaluó con  $p = 0.05$ .

Se demostraron los resultados de:

- a) Ecuación de la recta
- b) Coeficiente de correlación  $r$
- c) Coeficiente de determinación  $r^2$
- d) Gráfica de linealidad
- e) Intervalo de confianza  $\alpha$
- f) Intervalo de confianza  $\beta$

Se presentaron los resultados de los criterios de aceptación:

- a) Coeficiente de correlación  $r$  mayor o igual a 0.990
- b) Coeficiente de determinación  $r^2$  mayor o igual a 0.980
- c) El intervalo de confianza de la pendiente ( $\beta$ ) no debe de incluir el cero

### **Linealidad del método**

Se determinó la ecuación de la regresión lineal ( $y = a + bx$ ) la cual debe ser calculada por el método de mínimos cuadrados basado en lectura ( $y$ ) versus concentración ( $x$ ). La evaluación se realizó con  $p = 0.05$ .

Se demostraron los resultados de:

- a) Ecuación de la recta
- b) Coeficiente de correlación  $r$
- c) Coeficiente de determinación  $r^2$
- d) Gráfica de linealidad
- e) Intervalo de confianza  $\alpha$
- f) Intervalo de confianza  $\beta$

Se presentaron los resultados de los criterios de aceptación:

- a) Coeficiente de correlación  $r$  mayor o igual a 0.990
- b) Coeficiente de determinación  $r^2$  mayor o igual a 0.980
- c) El intervalo de confianza del intercepto ( $\alpha$ ) debe de incluir el cero

Después de realizadas todas las pruebas se emitió la conclusión de cada característica de validación.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 PARÁMETRO DE EXACTITUD

Los resultados que se obtuvieron en la exactitud de la materia prima se resumen en la siguiente tabla y se pueden observar en anexos de los cuadros No.1, 6, 11 y 16.

**TABLA No.1**

EXACTITUD PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, FENILEFRINA CLORHIDRATO Y GUAIFENESINA

<b>Materia prima</b>	<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Concentración 01</b>	<b>Concentración 02</b>	<b>Concentración 03</b>
Clorfeniramina Maleato	Nominal	80.00 %	100.00 %	120.00 %
	Valor medio	81.026200	100.495333	120.192000
	Coefficiente de variación	0.105581	0.080164	0.143847
	% Recupe.	101.28%	100.49%	100.16%
Dextrometorfano Bromhidrato	Valor medio	80.074400	99.565133	119.731667
	Coefficiente de variación	0.050058	0.021945	0.688070
	% Recupe.	100.01%	99.56%	99.78%
Fenilefrina Clorhidrato	Valor medio	80.055033	98.631700	119.497000
	Coefficiente de variación	0.161277	0.081733	0.637414
	% Recupe.	100.068%	98.63%	99.58%
Guifenesina	Valor medio	80.659167	99.848600	119.690667
	Coefficiente de variación	0.078580	0.117413	0.695644
	% Recupe.	100.82%	99.84%	99.74%

Los resultados que se obtuvieron en la exactitud de las materias primas que componen los Jarabes A y B se resumen en la siguiente tabla y se pueden observar en anexos de los cuadros No. 21, 22, 23, 36, 37 y 38.

**TABLA No. 2**

EXACTITUD PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO Y DEXTROMETORFANO CLORHIDRATO EN JARABE "A" Y "B"

Jarabe	Parámetro estadístico	Concentración 01		Concentración 02		Concentración 03	
		Dextro.	Clorfe.	Dextro.	Clorfe.	Dextro.	Clorfe.
A	Nominal	100.00%	100.00%	120.00%	120.00%	150.00%	150.00%
	Valor medio	97.822867	93.876100	121.235667	120.238000	149.101333	148.531667
	Coefficiente de variación	0.746033	0.745059	2.269117	2.007170	0.470224	0.210020
	% Recupe.	97.82%	93.88%	101.03%	100.20%	99.40%	99.02%
B	Nominal	80.00%	80.00%	100.00%	100.00%	120.00%	120.00%
	Valor medio	80.845767	80.926000	100.458133	99.948067	121.003000	121.120667
	Coefficiente de variación	0.548386	0.199305	1.021266	1.523579	0.651161	0.688135
	% Recupe.	101.06%	101.16%	100.46%	99.95%	100.84%	100.93%

**TABLA No. 3**

EXACTITUD PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN EN FENILEFRINA CLORHIDRATO EN JARABE "A" Y GUAIFENESINA EN JARABE "B"

Jarabe	Parámetro estadístico	Concentración 01	Concentración 02	Concentración 03
A Fenilefrina Clorhidrato	Nominal	100.00 %	120.00 %	150.00 %
	Valor medio	99.087600	121.275667	149.324667
	Coefficiente de variación	0.482636	2.350996	0.952139
	% Recupe.	99.09%	101.06%	99.55%
B Guaifenesina	Nominal	80.00 %	100.00 %	120.00 %
	Valor medio	93.031700	113.751333	109.107667
	Coefficiente de variación	0.243840	1.114107	17.24
	% Recupe.	116.29%	113.75%	90.93%



## 8.2 PARÁMETRO DE PRECISIÓN

### 8.2.1 REPETIBILIDAD

Los resultados que se obtuvieron en la repetibilidad de las materias primas se resumen en la siguiente tabla y se pueden observar en anexos de los cuadros No. 3, 8, 13 y 18.

**TABLA No. 4**

REPETIBILIDAD PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, FENILEFRINA CLORHIDRATO Y GUAIFENESINA

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Fenilefrina Clorhidrato</b>	<b>Guaifenesina</b>
Número de datos	6	6	6	6
Valor medio	102.593	102.297	99.912	102.169
Desviación estándar	1.959	1.948	1.650	1.889
Coefficiente de variación (%)	1.910%	1.904%	1.651%	1.849%
Intervalo de confianza	0.54 %	0.54%	0.45%	0.52%

Los resultados que obtuvieron en la repetibilidad de las materias primas que componen los jarabes A y B se resumen en la siguiente tabla y se pueden observar en anexos de los cuadros No. 27, 28, 29, 42, 43 y 44.

**TABLA No.5**

REPETIBILIDAD PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, Y FENILEFRINA CLORHIDRATO EN JARABE “A”

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Fenilefrina Clorhidrato</b>
Número de datos	6	6	6
Valor medio	97.482	99.405	99.912
Desviación estándar	0.461	0.554	1.650
Coefficiente de variación (%)	0.473%	0.558%	1.651%
Intervalo de confianza	0.13%	0.15%	0.45%

**TABLA No.6**

REPETIBILIDAD PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, Y GUAIFENESINA EN JARABE “B”

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Guaifenesina</b>
Número de Datos	6	6	6
Valor medio	103.398	106.257	112.802
Desviación estándar	1.361	1.509	1.444
Coefficiente de variación (%)	1.316%	1.42%	1.280%
Intervalo de confianza	0.37%	0.42%	0.40%

### 8.2.2 PRECISIÓN INTERMEDIA

Los resultados que se obtuvieron en la precisión intermedia de la materia prima se resumen en la siguiente tabla y se pueden apreciar en anexos de los cuadros No. 2, 7, 12 y 17.

**TABLA No. 7**

PRECISIÓN INTERMEDIA PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, FENILEFRINA CLORHIDRATO Y GUAIFENESINA

**Condiciones:** 2 analistas, 1 instrumento, 2 días

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Fenilefrina Clorhidrato</b>	<b>Guaifenesina</b>
Valor medio	101.2958	101.1500	99.4384	101.1584
Desviación estándar	0.0147	0.0188	0.01209	0.0147
Coefficiente de variación (%):	1.4520	1.8607	1.2162	1.4511
Número de datos	14	14	14	14

Los resultados que se determinaron en la precisión intermedia de las materias primas que componen los Jarabes A y B se resumen en la siguiente tabla y se pueden apreciar en anexos de los cuadros No. 24, 25, 26, 39, 40 y 41.

**TABLA No. 8**

PRECISIÓN INTERMEDIA PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO Y FENILEFRINA CLORHIDRATO EN JARABE "A"

**Condiciones:** 2 analistas, 1 instrumento, 2 días

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Fenilefrina Clorhidrato</b>
Valor medio	97.0278	102.4180	106.3059
Desviación estándar	0.0316	0.0191	0.0146
Coefficiente de variación (%):	2.00	1.8638	1.3774
Número de datos	12	12	14

**TABLA No. 9**

PRECISIÓN INTERMEDIA PARA EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, Y GUAIFENESINA EN JARABE "B"

**Condiciones:** 2 analistas, 1 instrumento, 2 días

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Guaifenesina</b>
Valor medio	100.7985	99.3392	100.1422
Desviación estándar	1.8911	2.0885	1.2948
Coefficiente de variación (%):	1.8761	2.000	1.2929
Número de datos	12	11	14

### 8.3 PARÁMETRO DE LINEALIDAD

#### 8.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Los resultados que se determinaron en la linealidad del sistema de la materia prima se resumen en la siguiente tabla y se pueden observar en anexos de los cuadros No. 4, 9, 14 y 19.

**TABLA No. 10**

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, FENILEFRINA CLORHIDRATO Y GUAIFENESINA

<b>Resultados</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Fenilefrina Clorhidrato</b>	<b>Guifenesina</b>
Ecuación de la recta	$Y = 26034882.26 X + -1551.90$	$Y = 19120775.44 X + 29244.89$	$Y = 24036572.52 X + 20429.01$	$Y = 32252697.33 X + 560546.31$
Coefficiente de correlación r	0.999	0.999	0.999	0.999
Coefficiente de determinación $r^2$	0.998	0.998	0.998	0.998

### 8.3.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Los resultados que se obtuvieron en la linealidad del método de las materias primas se resumen en la siguiente tabla y se pueden observar en anexos de los cuadros No. 5, 10, 15 y 20.

**TABLA No. 11**

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA  
CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO,  
FENILEFRINA CLORHIDRATO Y GUAIFENESINA

<b>Resultados</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Fenilefrina Clorhidrato</b>	<b>Guaifenesina</b>
Ecuación de la recta	$Y = 27845729.04X + 26.32$	$Y = 34782588.49 X - 2020.49$	$Y = 25237131.95 X - 19.56$	$Y = 34782588.49 X - 2020.49$
Coefficiente de correlación r	1.000	1.000	1.000	1.000
Coefficiente de determinación $r^2$	1.000	1.000	1.000	1.000

Los resultados que se obtuvieron en la linealidad del método de las materias primas que constituyen los Jarabes A y B se resumen en la siguiente tabla y se pueden observar en anexos de los cuadros No. 33, 34, 35, 48, 49 y 50.

**TABLA No. 12**

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL METODO PARA CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, FENILEFRINA CLORHIDRATO EN JARABE "A"

<b>Resultados</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Fenilefrina Clorhidrato</b>
Ecuación de la recta	$Y = 27845729.04 X + 26.32$	$Y = 34782588.49 X - 2020.49$	$Y = 25236571.88 X + 11.09$
Coefficiente de correlación r	1.000	1.000	1.000
Coefficiente de determinación $r^2$	1.000	1.000	1.000

**TABLA No. 13**

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA CLORFENIRAMINA MALEATO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO Y GUAIFENESINA EN JARABE "B"

<b>Resultados</b>	<b>Clorfeniramina Maleato</b>	<b>Dextrometorfano Bromhidrato</b>	<b>Guaifenesina</b>
Ecuación de la recta	$Y = 27845729.04 X + 26.32$	$Y = 34782588.49 X - 2020.49$	$Y = 34782588.49 X - 2020.49$
Coefficiente de correlación r	1.000	1.000	1.000
Coefficiente de determinación $r^2$	1.000	1.000	1.000

#### **8.4 PARÁMETRO DE ESPECIFICIDAD**

Se determinó la especificidad trabajando con muestras de materia prima de los principios activos Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromhidrato, Fenilefrina Clorhidrato y Guaifenesina y también con muestras de producto terminado de los Jarabes “A y B”. Se sometieron a temperaturas y reacciones ácidas (ácido clorhídrico), básicas (hidróxido de sodio), oxidación (agua oxigenada) y reducción (bisulfito de sodio). Se enfriaron las muestras y se ajustó el pH a neutro de todas las muestras y luego se inyectaron en el equipo.

En el método analítico aplicado puede distinguirse la respuesta de las sustancias de interés del resto de los demás componentes de una muestra al comparar los resultados de muestras que contengan el analito junto con resultados de muestras que no contengan dicho analito.

Ningún producto de degradación eluye en el mismo tiempo de retención de los picos de los analitos de interés.



## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### PARÁMETRO DE EXACTITUD

En los resultados de la exactitud para la materia prima en la tabla No. 1, la Clorfeniramina Maleato, Fenilefrina Clorhidrato, Dextrometorfano Bromhidrato y Guaifenesina, demuestran una recuperación de la adición de estándar a la matriz de los jarabes alrededor del 100% en la mayoría de los resultados obtenidos esto es debido a que están dentro del rango de aceptación de 98 – 102%, por lo que hay concordancia entre el valor experimental y el valor verdadero adicionado. El coeficiente de variación obtenido en la evaluación de este parámetro para cada uno de los principios activos es menor al 2%, tal como lo establece el límite de aceptación.

Con relación al Jarabe “A” en la tabla No.2, en las tres concentraciones que fueron analizadas el Dextrometorfano Bromhidrato y Clorfeniramina Maleato muestran un porcentaje de recuperación dentro del criterio de aceptación y en la concentración de 120% el coeficiente de variación está un poco arriba del criterio de aceptación se puede considerar dentro del rango de aceptación.

En la tabla No.3, la Guaifenesina correspondiente al Jarabe B, indica que no cumple con este parámetro porque se obtuvo un porcentaje de recuperación mayor al límite permitido (102%) en las tres concentraciones en que se evaluó este principio activo. Esto demuestra una posible interferencia de la matriz de excipientes del Jarabe B, la cual eluye en el mismo tiempo de retención que el pico de Guaifenesina.

### PARÁMETRO DE PRECISION

Este parámetro se evaluó con dos pruebas: la repetibilidad y la precisión intermedia. Para **la repetibilidad** en la materia prima en la tabla No. 4 se observó que se obtuvo el valor medio o porcentaje de recuperación en el límite permitido (102%) para los principios activos Clorfeniramina Maleato (102.593%), Dextrometorfano Bromohidrato (102.297%) y

Guaifenesina (102.169%), estos valores al aproximarlos están dentro del criterio de aceptación, el cual debe ser de 98-102%.

Al evaluar las muestras observadas en la tabla No. 5, Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromohidrato y Fenilefrina Clorhidrato del Jarabe “A”, mostraron un porcentaje de recuperación y coeficiente de variación dentro de los criterios establecidos para este parámetro, lo que indica que al analizar varias veces la misma muestra por un mismo analista, en el mismo día y equipo cromatográfico se obtienen datos con error relativo menor al 2%, el cual es debido a los errores en la preparación de la muestra inherentes al analista y también el error probable al momento de la inyección en el equipo automuestreador, el cual tiene una desviación estándar menor al 2% al momento de inyectar cualquier muestra. Los resultados de cuantificación de los analitos están alrededor del 98 al 102%, lo que indica que el método de análisis da resultados confiables con un 2% de variación, alrededor de la concentración al 100%.

Para el Jarabe “B” los resultados descritos en la tabla No.6, indican que fueron analizadas las muestras de Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromhidrato y Guaifenesina, las cuales presentaron un valor promedio que está fuera del rango del porcentaje de recuperación establecido, debido posiblemente a que durante el procedimiento de fabricación de las muestras se les adicionó un pequeño porcentaje de exceso de principios activos para evitar pérdidas durante el proceso de fabricación, lo cual pudo provocar obtener valores de cuantificación fuera del rango del 98 – 102%.

Al realizar el ensayo de **precisión intermedia** se evaluó como afectan al método analítico la variación de circunstancias ajenas a la metodología analítica como la influencia de la preparación de muestras por otro analista tomando en cuenta que cada persona trabaja de forma diferente adicionando errores inherentes a la preparación de las muestras o estándares y la influencia de la variación del día de análisis. Al examinar las muestras de la materia prima según la tabla No. 7, indica que los resultados del coeficiente de variación están dentro del criterio de aceptación menor o igual a 2%; el Jarabe “A” en la tabla No. 8 y el Jarabe “B” en la tabla No. 9, también cumplen con este criterio al mantener todos los

resultados en este rango. Por lo que indica que el método de análisis de estos principios activos no se ve afectado por la variación de analistas y el día en que se analice.

### **PARÁMETRO DE LINEALIDAD DEL SISTEMA**

La respuesta del equipo cromatógrafo líquido de alta resolución (en absorbancia) ante las diferentes concentraciones (mg/mL) demostró un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.999 lo que muestra que hay relación entre las mediciones y las concentraciones de los analitos. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenido 0.998 demuestra que la curva de regresión se ajusta a los valores experimentales de las mediciones evaluadas. Entonces, la respuesta del equipo demostró ser directamente proporcional a las distintas concentraciones y por ello lineal en este rango de concentraciones, para todos los principios activos analizados.

### **PARÁMETRO DE LINEALIDAD DEL MÉTODO**

El ensayo de cuantificación para las materias primas analizadas en la tabla No.11, mostró un coeficiente de correlación  $r$  y un coeficiente de determinación  $r^2$  aproximado a 1.000. En la tabla No.12, con respecto para la Fenilefrina en el Jarabe A es 0.999 en el coeficiente de correlación  $r$  y 0.998 para el coeficiente de determinación  $r^2$ . Si los resultados son proporcionales entre las concentraciones del analito y respuesta, se considera que el método es satisfactorio como sucede para la Guaifenesina en el Jarabe B de la tabla No. 13, que se obtuvo 1.000 para el coeficiente de correlación  $r$  y para el coeficiente de determinación  $r^2$ .

Al trabajar a las diferentes concentraciones indicadas tanto en las materias primas como en los Jarabes A y B, el coeficiente de correlación refleja un grado de relación lineal entre la respuesta del equipo y la variación proporcional de las concentraciones.

### **PARÁMETRO DE ESPECIFICIDAD**

Este parámetro evaluó si la respuesta del equipo era específica para los analitos que no resultan ser afectados por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica se realizó

con las materias primas y los productos farmacéuticos. Sometiendo para ello los estándares y muestras del Jarabe “A” y “B” a reacciones de oxidación, reducción, ácidas y alcalinas y acelerando la cinética de las mismas por medio de calor, esto con el fin de generar productos de degradación tanto de los principios activos como de excipientes.

El método es específico para la cuantificación de los principios activos en las materias primas en el Jarabe “A”, puesto que aunque hubo degradación de los analitos de interés y se generaron productos de degradación ninguno de estos eluyó en el mismo tiempo de retención que los principios activos, mas sin embargo no demostró ser específico para la determinación de Guaifenesina en el Jarabe “B”, debido a que se produce un compuesto de degradación el cual eluye al mismo tiempo de retención del principio activo por lo que interfiere en la cuantificación exacta del mismo y se suma a la lectura detectada por el equipo.

Se observó una reducción en la concentración de las materias primas y de los analitos en las muestras debido a la degradación provocada al someterlos a condiciones de temperatura, oxidación, reducción y pH.

## 10. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que cumplió con los requerimientos y normas ICH y Farmacopea Estadounidense (USP 2006) para la cuantificación de tres principios activos contenidos en dos medicamentos.
2. Se diseñó un método de análisis selectivo para la cuantificación de Maleato de Clorfeniramina, Bromohidrato de Dextrometorfano y Fenilefrina Clorhidrato utilizando cromatografía líquida de alta resolución como técnica.
3. Se determinó y demostró que la metodología propuesta cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia y especificidad según lo establece la Farmacopea Estadounidense (USP) y Normas de Validation of Analytical Procedures ICH.
4. Se proporcionó una metodología validada que se utiliza como guía a la industria farmacéutica para la cuantificación de estos principios activos y considerando que si se emplea en otros productos debe ser ensayada y validada nuevamente.
5. El método de análisis cumple con el parámetro de repetibilidad para el análisis de Clorfeniramina Maleato, Dextrometorfano Bromohidrado y Fenilefrina en el Jarabe “A” y “B”, porque se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2% al evaluar varias muestras con la metodología analítica a validar.
6. El método utilizado demostró ser lineal cuando se trabaja a concentraciones de 60% al 140% para cada uno de los principios activos analizados, lo que significa que al trabajar en dicho rango la respuesta del equipo será directamente proporcional a las concentraciones del analito.

7. El método validado demostró no ser específico y exacto para la cuantificación de Guaifenesina en el Jarabe “B”, porque los productos de degradación del mismo interfieren con su análisis, no así para la cuantificación de los analitos en materia prima y el Jarabe “A” ya que en los cromatogramas obtenidos para estas muestras, no se presentan picos de compuestos de degradación que eluya en el mismo tiempo de retención que los analitos de interés.
8. El método de análisis para la cuantificación de materia prima y en Jarabes comerciales “A” y “B”, por cromatografía líquida de alta resolución, cumple con los parámetros de precisión intermedia, linealidad del sistema y linealidad del método.
9. El método de análisis para la cuantificación de los principios activos y de los productos terminados Jarabe “A y B”, demostraron ser precisos cuando existan variaciones dentro del laboratorio como la preparación de muestras por diferentes analistas y el desarrollo del análisis en diferentes días.
10. La linealidad del sistema es aceptable en el método de análisis aplicado ya que los resultados presentan concordancia entre las concentraciones y las absorbancias por lo que se considera lineal.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Utilizar en todo el análisis del ensayo septas en los viales de los estándares y muestras, de la misma clase para evitar la evaporación de los solventes y que existan variaciones por problemas con la inyección de las muestras al no ser perforadas por la jeringa de la manera adecuada.
2. Colocar un estándar al principio, cada 6 muestras y al final de la cuantificación de los principios activos y del producto terminado.
3. Desgasificar los solventes y el agua HPLC cada vez que se analiza y se utiliza el equipo.
4. Establecer la técnica correcta de emplear las pipetas volumétricas al liberar el solvente, es decir sin soplar ni dar golpes.
5. Antes de iniciar el análisis cuantitativo de los compuestos o de los jarabes realizar los cálculos respectivos de la cantidad de fase móvil necesaria para el análisis y las diluciones.
6. Buscar un método alternativo para la cuantificación de la Guaifenesina en el Jarabe B en el cual no interfieran los productos de degradación o la matriz de dicho jarabe.
7. Si este método pretenden utilizarlo otras empresas para cuantificación de jarabes expectorantes es necesario tomar en cuenta que los parámetros de exactitud, especificidad y linealidad del método se deben evaluar para el jarabe que se desea cuantificar debido a los posibles interferentes de los excipientes empleados.

## 12. REFERENCIAS

1. Romero Gomero, Miguel. Desarrollo de Nuevas Metodologías Analíticas en el Control de Calidad de la Industria Farmacéutica. Disponible: [www.tdx.cesca.es/tesis\\_uab/available/TDX-0712102-102928//marg1de9.pdf](http://www.tdx.cesca.es/tesis_uab/available/TDX-0712102-102928//marg1de9.pdf).
2. Anleu Lainfiesta, Rossana. 2000. Validación del Método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la Cuantificación de Ibuprofeno en Suspensión. Pp. 52. Tesis Licenciada Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
3. Farmacia Práctica de Remington. 1998. 19ª ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana. Tomo 2. Pp 627, 630, 632.
4. Diccionario de Medicina. 1996. Océano Mosby. 4ª. Ed. Barcelona, España. Grupo editorial Océano. Pp 265, 377.
5. Index Merck. 2001. 13<sup>th</sup>. New Jersey, USA. Merck & Co. Pp 2196, 4571, 8180.
6. Guaifenesina. Consultado el 10 de mayo de 2006. Disponible en: <http://12.42.224.150/library/healthguide/es-us/drugguide/topic.asp?hwid>
7. Vademécum. Fenilefrina. Consultado el 10 de mayo de 2006. Disponible en: [www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f007.ht](http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f007.ht)
8. Seguridad en Laboratorio. Fenilefrina. Consultado el 10 de mayo de 2006. Disponible en: [www.segulab.com/fenilefrina.htm](http://www.segulab.com/fenilefrina.htm) - 17k



9. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Consultado el 10 de mayo de 2006.  
Disponible en: [www.ua.es/es/investigacion/sti/hpcl.htm](http://www.ua.es/es/investigacion/sti/hpcl.htm)
10. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Consultado el 10 de mayo de 2006.  
Disponible en: [www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/manchi/alim/Trabajo050405.doc](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/alim/Trabajo050405.doc)
11. Skoog D. A. 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. Barcelona, España. McGrawHill. Pp 751-753, 785-788.
12. Farmacopea de los Estados Unidos de América. 2006. Formulario Nacional. USP 29/NF Edición Anual en Español. Estados Unidos. Convención de Farmacopeica Estados Unidos. Pp. 3328-3331.
13. Normativa de Validación de Metodología Analítica. 2da revisión. Departamento de Regulación de Medicamentos y Productos Afines. Guatemala. 2006.
14. Arévalo Alvarado, Herberth Raúl. 2006. Validación Retrospectiva de Proceso de Manufactura y Método de Análisis de Cápsulas de Diclofenaco Sódico 50 mg. Pp. 2, 46-47. Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad del Valle de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Departamento de Química Farmacéutica.
15. Pinzón Meza, Mario René. 2003. Implementación de Metodología para Acido Valproico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Validación por Cromatografía de Gases con Detector Selectivo de Masas en Muestras Séricas. Pp. 55. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.

16. Franco Flores, Anabelly Carolina. 2002. Guía Para Validar Métodos Analíticos Nuevos o Modificados Para Productos Farmacéuticos. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
17. De León Barrientos, Sandra. 1998. Validación del Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución Para Cuantificación de Vitamina "A" en Tabletas Multivitamínicas Masticables. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
18. Introducción a la Química Farmacéutica. 2001. 2ª ed. España. McGrawHill/Interamericana de España, S.A.V. Pp. 175, 194, 801.
19. Escobar Ortiz. 2001. Validación de un Método para la Cuantificación de Penicilina G Sódica en Aguas Residuales de una Industria Farmacéutica. Pp. 60. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad del Valle de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Departamento de Química Farmacéutica.
20. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2000. 7ma edición. Tomo 1, 2. Introducción a la Química Farmacéutica. 2001. 2ª ed. España. McGrawHill/Interamericana de España, S.A.V. Pp. 175, 194, 702-703, 728, 775 - 777, 801. México.
21. Farmacopea Británica. 2004. Volumen I. México. Pp. 614 -615, 938 -939.
22. Validación de Técnicas Analíticas. Programa de cálculos estadísticos establecido y recomendado por la USP 25, FDA e ICH con la implementación de algoritmos y estadígrafos.

23. The Japanese Pharmacopoeia. 2001. 14<sup>th</sup> edition. Japan. Society of Japanese Pharmacopoeia. Pp. 1357.
24. Martindale. 2003. Guía Completa de Consulta Farmacoterapéutica. 1<sup>a</sup> edición en español. Estados Unidos. Pharmaceutical Press. Pp. 543, 790-791, 795-796, 797-798.
25. Pharmaceutical Process Validation. 1993. Second edition revised and expanded. Estados Unidos. Marcel Dekker, Inc. Pp. 601.
26. Samol Sayes, Ángela Teresa. 2007. Estandarización del Método Utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud para la Identificación y Cuantificación de Clotrimazol en Óvulos Sólidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Pp. 69. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.

## 13. ANEXOS

### 13.1 GLOSARIO

**Método analítico:** Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado.

**Procedimiento analítico:** Forma en que se realiza el análisis. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica.

**Validación de un método analítico:** Proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método, cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

**Parámetros de desempeño analítico:** Características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, linealidad e intervalo de linealidad.

**Exactitud del método:** Es la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse. La exactitud se expresa como un porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en la forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero.

**Linealidad:** Es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

**Intervalo de linealidad:** Ámbito o rango entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

**Precisión del método:** Es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o expresado de otra forma, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media.

**Precisión intermedia:** Es un término introducido recientemente y expresa la precisión dentro de un laboratorio cuando se emplea una muestra homogénea y se analiza con una o más condiciones diferentes, es decir diferentes analistas, o en días diferentes, o en equipos diferentes, etc. La precisión intermedia refleja las condiciones reales de un laboratorio.

**Repetibilidad:** Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos, y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente en un corto intervalo de tiempo.

**Especificidad:** Es la capacidad de evaluar sin equivocarse el analito en la presencia de los componentes que pueden suponerse se encuentren presentes, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

## 13.2 DESCRIPCIÓN DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad.

Algunos ejemplos para su utilización incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas.

Para evaluar la importancia de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es necesario distinguir entre los dos papeles que desempeña la técnica. El primer papel consiste en separar y el segundo en determinar los componentes separados. Los datos proporcionados por la señal del detector se utilizan generalmente para el análisis cuantitativo y semicualitativo:

1. Alturas de los picos o sus áreas dan información cuantitativa. Se comparan las áreas de los estándares en las calibraciones.
2. Tiempos de retención para la identificación semicualitativa. No es cualitativo debido a que el tiempo de retención puede coincidir con otro compuesto diferente en las mismas condiciones de análisis cromatográfico.

Para la elección de la fase móvil se requiere el uso de fases móviles de dos o más componentes. El tipo de cromatografía elegida y los detectores disponibles afectan en la elección de los líquidos que se utilizan en la composición de la fase móvil. Generalmente la elección de la fase móvil depende de la solubilidad y estabilidad de la muestra, la cantidad de muestra, tipo de separación que se requiere y pureza de la muestra.

Las columnas (fase estacionaria) para cromatografía de líquidos se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. Las más comunes se encuentran empacadas con esferas de resina. La elección de la fase estacionaria depende de diversos factores, como las características y la complejidad de la muestra y del tipo de separación elegido.

El detector de uso más corriente es esencialmente el espectrofotómetro UV que puede trabajar a una longitud de onda fija o bien permitir la selección de la longitud de onda dentro de un intervalo determinado. Si se conocen las propiedades de los compuestos a separar es fácil de seleccionar el detector y la longitud de onda. Si los compuestos absorben dentro del intervalo del detector, se escoge esta longitud de onda. Aunque lo

mejor es conocer el espectro UV de los componentes de la muestra. También es conveniente usar información bibliográfica pues es posible elegir la longitud de onda apropiada basándose en el trabajo efectuado por otros analistas con compuestos similares.

Un detector ideal para HPLC debe poseer todas las propiedades listadas a continuación:

1. Adecuada sensibilidad.
2. Buena estabilidad y reproducibilidad del detector al inyectar la misma muestra.
3. Respuesta lineal.
4. Tiempo de respuesta corto.
5. Alta fiabilidad y manejo sencillo.
6. Respuesta semejante para todos los analitos, o una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.
7. No destructivo de la muestra <sup>(18)</sup>.

