

UNIVERSIDAD CENTROAMERICANA DE CIENCIAS EMPRESARIALES
UCEM

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
CARRERA DE FARMACIA



**“VALIDACIÓN DE METODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE DROGAS ANTITUSIVAS
POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN
(HPLC) EN LABORATORIOS PANZYMA S.A, ENTRE SEPTIEMBRE
DICIEMBRE DEL 2001.**

“TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO EN FARMACIA”

AUTORES:

- Br. ALDEN HAROLDO BACA GONZALEZ
- Br. ESTEBAN DANIEL GONZALEZ PAVON

TUTOR ESPECIALISTA : Lic. EDWARD GAMEZ ULLOA

TUTOR METODOLÓGICO : Dra. SOLEDAD PATRICIA CORTES

MANAGUA, NICARAGUA 2002

UCEM - 2002

Publicado

DEDICATORIA

Dedico esta Monografía a DIOS padre y Maria Santisima, madre y reina. Quienes con sus gracias espirituales me ayudaron en este largo camino.

A mi padre:

William Baca Monllieri, por su cariño y consejos que me ha brindado.

A mi madre:

Lilliam Baca González Delgado, por su amor y ternura que me ha brindado todos estos años.

A mi Esposa Ivett de la Cruz Vargas Espinoza, hijos y hermanos.

Se la dedico a Eigil Hoigjelle , que sin su ayuda nunca hubiera sido realidad el sueño de mi vida, además es para mí, como un segundo padre.

Alden Haroldo Baca.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios nuestro creador y guía que supo darme fuerzas, animo y tiempo para culminar esta carrera.

Ami esposa María Elena, a quien amo y es parte de mi vida y que ha sabido darme amor , comprensión y fuerzas en los momentos mas difíciles, compartiendo experiencias y alegrías.

A mis hijas Daniela María y Hellen Estefania , por su ternura y comprensión de cada día.

A Fabio José, Carmen María y José David , por apoyarme siempre.

A mis padres por sus consejos y buenos ejemplos que a lo largo de la vida me han brindado.

A mis hermanos que han sabido compartir los tiempos buenos y malos que nos depara la vida.

Esteban Daniel González Pavón

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Laboratorios Panzyna S.A, y a su Gerente el Sr. Eigil Høigjelle, por su apoyo en la realización de este trabajo, en especial al departamento de Control de Calidad.

Al Lic. Edward Gámez Ulloa por su gran dedicación y entrega en la realización de este trabajo monográfico.

INDICE

	Página
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
A. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
B. JUSTIFICACION	3
C. OBJETIVOS	4
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	5
A. ANTECEDENTES	5
B. INFORMACIÓN SUSTANTIVA	7
NOSCAPINA HCL	7
DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO	9
CROMATOGRAFO DE LÍQUIDOS	12
VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS	50
CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	63
A. TIPO DE ESTUDIO	63
B. UNIVERSO	63
C. TIPO DE MUESTRA Y MUESTREO	63
D. GENERACIÓN DE INFORMACIÓN	63
E. DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO	64
F. FORMA DE RECOLECTAR LOS DATOS	64
G. PROCESAMIENTO DE DATOS	64
H. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS Y TABLAS	65
I. FORMA DE PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS	65
J. DISEÑO DE VALIDACIÓN DEL METODO	65
CAPITULO IV : PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	83
A. METODO VALIDADO DE DEXTROMETORFANO	83
B. METODO VALIDADO DE NOSCAPINA CLORHIDRATO	87
C. APLICACIÓN DE LOS CRITERIOS DE VALIDACIÓN	90
CAPITULO V:	
CONCLUSIONES	117
RECOMENDACIONES	118
BIBLIOGRAFIA	119
ACRONICOS	122
GLOSARIO	123

INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla No. 1. Linealidad del sistema de noscapina clorhidrato	91
Tabla No. 1A. Resultados de linealidad del sistema de noscapina clorhidrato	92
Tabla No. 2. Precisión del sistema de noscapina clorhidrato	94
Tabla No. 2A. Resultados de precisión del sistema de noscapina clorhidrato	94
Tabla No. 3. Linealidad método de noscapina clorhidrato	95
Tabla No. 3A. Resultados de linealidad del método de noscapina clorhidrato	96
Tabla No. 4. Exactitud del método de noscapina clorhidrato (toseba)	98
Tabla No. 4A. Resultados de exactitud del método de noscapina HCL	98
Tabla No. 5. Determinación de la precisión (reproducibilidad) toseba	99
Tabla No. 5A. Resultados de la precisión (reproducibilidad) toseba	100
Tabla No. 6. Estabilidad de la solución estándar de noscapina HCL	100
Tabla No. 7. Robustez de Noscapina clorhidrato	101
Tabla no. 8. Linealidad del sistema del Dextrometorfano Bromhidrato	103
Tabla No. 8A. Resultados de linealidad del sistema de Dextrometorfano HBr	104
Tabla No. 9. Precisión del sistema de Dextrometorfano Bromhidrato	106
Tabla No. 9A. Resultados de precisión del sistema de Dextrometorfano HBr	106
Tabla No. 10. Linealidad método de Dextrometorfano Bromhidrato	108
Tabla No. 10A. Resultados de linealidad del método de Dextrometorfano HBr	109
Tabla No. 11. Exactitud del método de Dextrometorfano HBr	111
Tabla No. 11A. Resultados de exactitud del método Dextrometorfano HBr	112
Tabla No. 12. Determinación de la precisión (reproducibilidad) dextrometorfano HBr	113
Tabla No. 12A. Resultados de la precisión (reproducibilidad) Dextrometorfano HBr	114
Tabla No. 13. Estabilidad de la solución estándar de Dextrometorfano HBr	114
Tabla No. 13A. Robustez de Dextrometorfano Bromhidrato	116

INDICE DE GRAFICOS

	Pagina
Grafico No. 1 . Linealidad del sistema Noscapina HCL solucion estandar	93
Grafico No. 2. Linealidad del método Noscapina HCl (Jarabe)	97
Grafico No. 3. Linealidad del sistema del Dextrometorfano HBr solucion estandar	105
Grafico No. 4. Linealidad del método Dextrometorfano HBr (Jarabe)	110

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica esta especialmente interesada en la validación de métodos analíticos, con el objetivo de obtener resultados confiables.

Es por esto, que los laboratorios de Control de Calidad de los organismos reguladores y de las Industrias Farmacéuticas deben de contar con técnicas analíticas versátiles, confiables y reproducibles para el análisis y control de drogas consumidas por nuestra sociedad.

La validación de los métodos analíticos constituyen una parte esencial tanto en el desarrollo de las técnicas analíticas encaminadas al control de calidad y estudios de estabilidad de materias primas y productos terminados como a los procesos de fabricación y deberán efectuarse conforme a los protocolos establecidos con antelación al desarrollo de los mismos.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.

A. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento de nuevos productos farmacéuticos como los antitusivos; en especial Noscapina Clorhidrato y el Dextrometorfano Bromhidrato, la industria farmacéutica, así como el gremio de médicos están especialmente interesados en ofertar medicamentos de alta calidad y biodisponibilidad. y requieren de un control de calidad estricto. Debido a su toxicidad se necesita asegurar su calidad por medio de métodos de análisis cuali y cuantitativos adecuados .

Es por ello que se efectúan normas de calidad para un producto que principio deben ser analizados con un método validado, razón que conlleva a la necesidad de desarrollar un método que garantice resultados confiables y reproducibles para el beneficio de la industria farmacéutica, se quiere demostrar en el desarrollo de la validación del método, que ambos productos pueden ser analizados en las mismas condiciones cromatográficas.

El proceso de validación de un método en particular esta basado en principios científicos adecuados y optimizados para propósitos prácticos de medición, expresándose la capacidad del método en términos de parámetros analíticos.

B. JUSTIFICACIÓN

Considerando, que en toda industria fabricante de productos farmacéuticos debe de existir obligatoriamente un departamento de Control de Calidad que sea independiente de los departamentos de fabricación provisto de medios adecuados para garantizar la calidad de materias primas y productos terminados mediante ensayos físicos y químicos. De los resultados obtenidos se decide la aceptación o rechazo del lote para después ser proyectado al mercado o en caso contrario retenido. Los fabricantes de productos farmacéuticos en la actualidad asumen la responsabilidad de la calidad de lo producido, pues son los únicos que pueden evitar los errores ejerciendo la adecuada atención a sus procedimientos de fabricación y de calidad.

Para controlar y asegurar la calidad del producto, necesitamos contar con métodos analíticos validados. Debe señalarse que el ministerio de salud actualmente exige que la documentación del Laboratorio contenga métodos de análisis validados.

Los métodos analíticos validados, deben ser utilizados por los Departamentos de Control de Calidad como "herramientas" de trabajo que aseguren la calidad del producto y la diversidad de formas farmacéuticas elaboradas (jarabes, tabletas, inyectables, colirios etc.) exigen técnicas de análisis específicas y propias.

C. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Validar un método analítico para la determinación cuantitativa de Drogas Antitusivas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en Laboratorio PANZYMA, entre Septiembre y Diciembre del 2001.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Validar un método analítico cromatográfico para antitusivos que sirva de guía al CONTROL DE CALIDAD de laboratorios panzyna.
- Optimizar la fase móvil para el método analítico.
- Aplicar los criterios de validación analítica para la determinación cuantitativa de drogas antitusivas.

OBJETIVO PROPOSITIVO:

Desarrollar un método válido, reproducible y confiable que sea adecuado para el análisis de drogas antitusivos en laboratorios panzyna.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

A. ANTECEDENTES

Según McNAIR, Harold y ESQUIEL, Benjamin. Cromatografía Líquida de Alta Presión. No. 10 Serie Química. Organización de los Estados Americanos. Washington. 1973. Pág. # 3,4,5,6, La Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) data cerca de 75 años de desarrollo como técnica de separación. Con el advenimiento de la instrumentación moderna la CLAR brinda cuantificación y reproducibilidad de manera rápida y simple.

Fue en el año de 1903 cuando el ruso Botánico Michael Tswett utilizó Cromatografía de columna para separar los pigmentos de ciertas plantas como Carotina que da el color amarillo - anaranjado de la zanahoria. También de Xantofilia que da el pigmento amarillo de ciertas células vegetales. Estos pigmentos fueron extraídos con petróleo usando una fase estacionaria de carbonato de calcio.

En 1952 el premio Nóbel fue otorgado a Martin y James por trabajos realizados en Cromatografía líquida. En 1967 el Cromatógrafo de Líquidos LSC - 1000 se introdujo en el mercado.

Los contribuyentes al desarrollo de la Cromatografía líquida de alta resolución son muchos. Pero un punto científico que debemos notar es que la CLAR crece como una extensión, cumpliendo la necesidad de analizar aquellos componentes que no toleran una fase móvil gaseosa o temperaturas muy elevadas. Por consiguiente, la CLAR no destruye la muestra y esto en gran parte a contribuido a su enorme popularidad.

La Cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La mezcla es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenida por la fase estacionaria.

Los componentes de la mezcla se transportan a través de una fase estacionaria por medio de una fase móvil que fluye; las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los componentes de la mezcla.

B. INFORMACIÓN SUSTANTIVA.

B.1. NOSCAPINA CLORHIDRATO

Farmacología

Es un alcaloide isoquinolinico que tiene la propiedad de suprimir el reflejo de la tos sin afectar de manera significativa otras actividades del sistema nervioso central.

Mecanismo de acción.

La Noscapina suprime la tos mediante un mecanismo de acción depresor sobre el centro de la tos localizada en el SNC. Este mecanismo de acción es común para todos los antitusivos de tipo opiodes naturales, semisintéticos o sintéticos.

El efecto antitusivos ha sido suficientemente documentado, producto de experimento en animales, así como en voluntarios sanos y en pacientes con tos crónica lo cual pone en evidencia que la noscapina se une a sitios específicos en el cerebro, bloqueando el reflejo tusígeno. Aunque este medicamento se obtiene de la misma fuente de donde se obtienen principios con actividad analgésica como la morfina , este producto no manifiesta propiedades supresoras del dolor , así como tampoco manifiesta otras acciones depresoras como la sedación, euforia o la acción depresiva de la respiración y en general se considera con muy poca acción sedante . Por tanto la única acción evidente de este principio activo es la supresión de la tos, razón por la cual se ha utilizado con mucho éxito desde hace aproximadamente 30 años.

B.1.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS DROGAS VALIDADAS

NOSCAPINA HCL

Fórmula Molecular: $C_{22}H_{23}NO_7 \cdot HCl, H_2O$

Peso Molecular: 467.9

Formula Estructural:



Nombre Químico:

(3S)-6,7-Dimethoxy -3-[(5R)-5,6,7,8 -tetrahydro-4-methoxy -6-methyl-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinolin -5- y1] phthalide.

Categoría terapéutica: Antitusivo

Descripción: Polvo blanco cristalino fino o cristales incoloros.

Solubilidad:

Soluble en agua, etanol, y cloroformo; Prácticamente insoluble en éter.

Requisitos Generales:

La Noscapina no contiene menos del 98%, ni más del 101% de $C_{22}H_{23}NO_7HCl$, H_2O .

**FORMULA CUALI-CUANTITATIVA DE NOSCAPINA CLORHIDRATO
(TOSEBA)**

CADA 100ML DE JARABE DE TOSEBA CONTIENE:

1. Noscapina Clorhidrato 0.3g.
2. Sacarina Sódica 0.04g.
3. Alcohol (Etanol) 15ml.
4. Sacrosa 85%0.034Kg.
5. Metil Parabeno 0.05g.
6. Propil Parabeno0.02g.
7. Glicerina22.5ml.
8. Sorbitol 22.5ml.
9. Sabor chocolate 15gtas.
10. Agua destilada 100ml

B.2. DEXTROMETORFANO, BROMHIDRATO DE:

Farmacología

El brohidrato de dextrometorfano es un derivado sintético de la morfina utilizado exclusivamente como antitusivo. El dextrometorfano actúa centralmente elevado en el umbral para la tos. Estudios controlados en humanos indican que su potencia para suprimir la tos, es similar al de la codeína. Sin embargo, a diferencia de la codeína, raramente produce somnolencia o trastorno gastrointestinal.

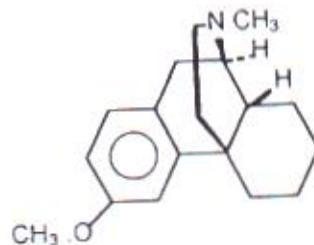
durante un periodo de 8 a 12 horas. A diferencia de la codeína, esta exento de propiedades analgésicas.

B.2.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS DROGAS VALIDADAS DE DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO.

Fórmula Molecular: $C_{18} H_{26} NO \cdot HBr \cdot H_2 O$

Peso Molecular: 370.33

Formula Estructural:



Nombre químico:

Bromhidrato de (+)-cis-1,3,4,9,10,10 a., - hexahidro-6- metoxi -11- metil - 2H - 10, 4a - iminoetano fenantreno monohidrato.

Categoría terapéutica: Antitusivo.

Descripción: Polvo cristalino blanco o casi blanco inodoro o casi inodoro. Funde a unos 125 °C, con descomposición.

Solubilidad: Poco soluble en agua, fácilmente soluble en etanol y cloroformo; prácticamente insoluble en éter.

Solubilidad: Poco soluble en agua, fácilmente soluble en etanol y cloroformo; prácticamente insoluble en éter.

Requisitos Generales: El Bromhidrato de Dextrometorfano contiene no menos del 98.0% ni más del 101.0% de $C_{18}H_{26}NO \cdot HBr \cdot H_2O$ calculada en relación con la sustancia anhidra.

FORMULA CUALI – CUANTITATIVA DE DEXTROMETORFANO

BROMHIDRATO

CADA 100ML DE DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO CONTIENE:

1. Dextrometorfano Bromhidrato 0.15g.
2. Sacarina sódica 0.01g.
3. Sacarosa 38g.
4. Edta 0.1g.
5. Glicerol 7ml.
6. Benzoato de sodio 0.1g.
7. Acido cítrico 0.025g.
8. Citrato de sodio 0.024g.
9. Saborizante naranja 0.25ml
10. Sabor menta 0.33ml
11. Colorante naranja c.s.p
12. Agua destilada 100ml.

C. CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS

Introduction to Modern Liquid Chromatography; L. Snyder y J. Kirkland, 2da. ed., Ed. J. Wiley (1979). Pág. 25-33, la moderna cromatografía líquida en columna se desarrolla en los denominados cromatógrafos de líquidos que, al igual que los cromatógrafos de gases, tienen categoría de instrumento ya que proporcionan información sobre la composición de la materia al tener un detector continuo integrado "on-line" en el sistema hidrodinámico cromatográfico.

Esta denominación no es correcta cuando se refiere a la modalidad clásica a baja presión con recogida de las fracciones del eludido y determinación posterior.

C.1. LOS COMPONENTES DE UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS SE DISTINGUEN:

C.1.1. Aquellos que son indispensables para la modalidad isocrática simple (deposito de disolvente, bomba de alta presión, sistema de inyección, columna, detector continuo y registrador). Es interesante resaltar que no es absolutamente preciso un control térmico de la columna, en contraste con la CG.

C.1.2. Aquellos que son precisos para llevar a cabo una elusión con variación de la composición de la fase móvil (depósitos con varios disolventes, sistema electrónico de programación de gradiente con una o varias bombas de alta o baja presión, con o sin cámara de mezcla).

C.1.3. Aquellos que mejoran el funcionamiento, tales como el supresor de pulsos y el control de temperatura de la columna, o los que controlan el funcionamiento de la bomba (regulador de caudal, indicador de presión) que aseguran que llegue al inyector un flujo libre de pulsos a una presión y caudal seleccionados. Existen sistemas automáticos de realimentación (feedback) que regulan constantemente el funcionamiento de la bomba a través de las señales suministradas por los indicadores.

C.1.4. Aquellos que mejoran notablemente el sistema tradicional de toma y tratamiento de datos: un integrador electrónico o microprocesador que, a través de una impresora plotter (o pantalla), ofrecen los resultados según requerimientos aplicando programas de discriminación matemática entre picos. En la actualidad este componente es ya imprescindible.

C.1.5. Aquellos que están orientados a fines preparativos (colector de fracciones).

En la actualidad, la variedad de cromatógrafos líquidos asequibles en el mercado es amplia. A diferencia de los cromatógrafos de gases, existen dos grandes opciones según la concepción instrumental. La más económica y versátil es la que responde a un diseño modular, de tal manera que sobre un diseño básico pueden ir acoplándose o sustituyéndose diversos módulos (v.i. para pasar de la modalidad isocrática a la de gradiente basta incorporar una bomba más y un controlador de mezcla) o sustituir los detectores que en CLAR tienen una variedad mucho más

amplia que en CG. Cada vez es más frecuente en el comercio la opción integral que tiene la ventaja de un control único a través de un microprocesador, lo que sin duda reduce la intervención humana y eleva la seguridad del proceso analítico, pero tiene los inconvenientes derivados de la falta de flexibilidad (generalmente los módulos no pueden operar independientemente) y el elevado costo.

A continuación se van a describir las características fundamentales de los componentes de un cromatógrafo de líquidos insistiendo más en sus prestaciones que en sus características técnicas mecánicas y electrónicas que rebasan el propósito de esta monografía.

D.PROPIEDADES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (PRESIÓN)

D.1. Sistema de inyección:

Se trata de montajes más o menos sofisticados diseñados para introducir un volumen pequeño de muestra líquida en el sistema hidrodinámico de alta presión, lógicamente entre el sistema de bombeo y la columna cromatográfica.

El nombre "inyección" no es del todo adecuado y proviene de la primera modalidad descrita y empleado. De forma correcta deberían denominarse sistemas de "inserción", o "introducción", aunque la denominación histórica permanece en la actualidad.

Un sistema de inyección en CLAR debe cumplir una serie de requisitos:

D.2. Introducir volúmenes pequeños (del orden de μL) y reproducibles de muestra.

D.3. Debe originar la menor dispersión física posible del volumen mezclado en el sistema hidrodinámico para evitar que los picos cromatográficos se ensanchen (menor sensibilidad y más posibilidades de solapamiento).

D.4. Su funcionamiento no debe alterar las características hidrodinámicas del sistema: no interrumpir el flujo y no variar momentáneamente la presión y el caudal.

D.4.1. Una primera distinción entre los sistemas de inyección en CLAR hace referencia a la intervención humana en la operación de introducción de un pequeño volumen de muestra:

D.4.2. Los inyectores manuales.

D.4.3. Los inyectores automáticos, generalmente con un muestreador incorporado.

Los sistemas de inyección pueden clasificarse también según la forma de llevar a cabo la inserción de la muestra en la fase móvil en dos tipos: sin y con válvula rotatoria de inyección.

D.5. KATZ, Elena. Quantitative Analysis using Chromatographic Techniques. Separation Science Series. John Wiley & Sons. USA. 1987. Pag. # 103-105, los sistemas más frecuentes de introducción de muestras sin válvulas de inyección son los denominados "de jeringa", que tienen un parecido formal con los empleados en CG. Se basa en un septum que es atravesado por la aguja de la jeringa y que separa el exterior (presión atmosférica) del sistema hidrodinámico a alta presión: la fase móvil penetra lateralmente y se dirige a la columna; ésta está protegida de la acción de la punta de la aguja por un disco de vidrio pulverizado que evita la alteración del empaquetamiento. Son diversos los problemas que este diseño simple comporta:

D.5.1. No puede operar a presión muy elevada pues el septum y la jeringa no la resisten. Existen montajes especiales tipo sándwich (acero – septum – acero) que permiten llegar hasta 3000 psi, y jeringas de alta presión diseñadas para este fin.

D.5.2. El septum origina una serie de problemas específicos:

D.5.3. Debe remplazarse con una cierta frecuencia.

D.5.4. Puede disolverse parcialmente en la fase móvil originando picos falsos.

D.5.5. Puede fragmentarse por repetidos pinchazos depositándose al principio de la columna y afectando a la permeabilidad y eficacia de la misma.

D.5.6. Puede retener solutos por adsorción.

D.5.7. Pueden originarse dispersiones elevadas según el tamaño interno de la cámara de inyección, que es preciso que sea lo más pequeña posible.

D.5.8. Pueden originarse pérdidas de muestra por el fenómeno de "backflushing" alrededor de la aguja de la jeringa en el momento de la inyección.

D.5.9. La reproducibilidad alcanzada es baja (siempre superior al 2%), lo que es debido principalmente a la gran imprecisión que tiene la forma manual de introducir la muestra a través de la jeringa.

Existe una serie de diseños especiales para evitar parcialmente los problemas enunciados. Así, un montaje con dos válvulas de apertura y cierre permite inyectar la muestra en una minicámara a presión atmosférica y un cambio de la situación de las válvulas permite el arrastre de la misma hacia el detector. También existen módulos con una pieza plana móvil que se retira en el momento de la inyección y después se introduce para aislar el septum de la fase móvil.

SCOTT, Raymond P.W. Techniques and Practice of Cromatography. Vol. 70. Cromatographic Science Series. Marcel Dekker. USA. 1995. Pag. # 78-86, 102-106. las válvulas rotatorias de inyección de alta presión son la alternativa más empleada en los cromatógrafos de líquidos actuales para introducir micro volúmenes de muestra líquida. Se basan en el funcionamiento de una válvula de seis vías (dos de entrada, dos de salida y dos conectadas entre sí mediante un bucle de un volumen dado). En la posición de llenado, la muestra es introducida mediante una jeringa o por aspiración al bucle cuyo volumen interno corresponde al inyectado; la fase móvil es dirigida directamente a la columna. Al imponer un giro a la válvula las interconexiones cambian; ahora la fase móvil pasa a través del bucle que contiene el micro volumen de muestra y se dirige a la columna, mientras que la muestra es enviada al desecho. Al iniciar una nueva operación de inyección, la nueva muestra debe arrastrar completamente a la siguiente para evitar contaminación mutua, lo que exige el gasto de un volumen entre 3 y 10 veces mayor que el realmente insertado.

D.6. Es necesario indicar que para personal no experto la jeringa sigue siendo la forma de introducción, aunque las diferencias respecto al sistema anterior con septum son notorias. Las ventajas de la válvulas rotatorias de inyección son:

D.6.1. Medida más cómoda y segura del volumen a través del bucle, que puede intercambiarse para conseguir el deseado.

D.6.2. No altera el flujo de fase móvil y puede operar directamente a alta presión.

D.6.3. Puede operar a temperaturas superiores a la del ambiente con comodidad.

D.6.4. La precisión alcanzada es notoriamente mayor (desviaciones inferiores al 0.2%), lo que probablemente es debido a la reducción del factor humano respecto a la alternativa de jeringa.

E.SISTEMA DE BOMBEO A ALTA PRESIÓN

La bomba de alta presión constituye una de las partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos: Su funcionamiento controlado, regular y adecuado a los requerimientos es un aspecto clave en la CLAR. Debe cumplir una serie de requisitos que se resumen a continuación:

E.1. Ofrecer un amplio rango de presiones: De 500 a 5000 psi, (siendo $14,5 \text{ psi} = 1,02 \text{ Kg/cm}^2 = 0,9868 \text{ atmósferas}$), según longitud de la columna y grado de empaquetamiento. Una vez seleccionada la presión, debe permanecer constante con el tiempo.

E.2. Ofrecer caudales variables desde 0,5 a 10 mL/min para fines analíticos, y hasta 50 – 100 mL/min para fines preparativos. Una vez seleccionado el caudal, debe sufrir variaciones inferiores al 0,5-0,1%, según precisión requerida. Este aspecto es fundamental en la reproducibilidad de la CLAR.

Otra faceta práctica es la capacidad de la bomba para originar el mismo caudal repetidamente, es decir, cada vez que se ponga en marcha. Los modelos actuales tienen una indicación digital del caudal originado.

E.3. Originar un flujo libre de pulsaciones que se producen por el movimiento mecánico de vaivén ciertos tipos de bombas. La única forma segura de eliminación consiste en utilizar una bomba de doble pistón o dos bombas en serie, sincronizando los dos flujos de tal forma que se compensen los pulsos respectivos.

E.4. Debe ser inerte químicamente, en especial las zonas en contacto con la fase móvil; generalmente su interior es de acero inoxidable o teflón.

Una distinción básica entre los numerosos tipos de bombas descritas en CLAR se fundamenta en el tipo de energía empleada para originar el flujo a alta presión.

Según BIDLINGMEYER, Brian A. *Practical HPLC Methodology and Applications*. Wiley-Interscience. BRISTOW, P.A. *Liquid Chromatography in Practice*. Hstp. England. 1976. Pag. # 45-46, 68-75. Las denominadas "bombas de presión constante" emplean una fuente de gas inerte a alta presión; los tipos más importantes son las de desplazamiento gaseoso y las de amplificación neumática. Las llamadas "bombas de volumen constante" emplean energía eléctrica que pone en marcha un motor cuyo movimiento origina el flujo; los tipos más importantes son: de jeringa o desplazamiento y de vaivén en sus variedades de diafragma y de

pistón. A continuación se realiza una descripción somera de las mismas y se discuten sus ventajas e inconvenientes.

La parte más importante de una bomba de desplazamiento gaseoso es un cilindro o serpentín que contienen la fase móvil líquida, por el que penetra un gas a alta presión. Un conducto de salida, cuyo extremo se sitúa en el fondo, se conecta al sistema cromatográfico. La regulación del flujo se consigue controlando la presión del gas. Un conjunto de válvulas permite el llenado de la fase móvil cuando se agota. Sus ventajas más significativas son: Flujo libre de impulsos y bajo precio de mantenimiento. Sus principales inconvenientes son: poca variabilidad en la presión de salida, poco aptas para sistemas de gradientes y limitada capacidad volumétrica de la fase móvil.

La bomba de amplificación neumática emplea un pistón accionado mediante un gas a presión en una cámara de volumen elevado en relación con el tamaño del pistón. La regulación de las presiones y caudal de la fase móvil. Dos válvulas de bolas que flanquean al pistón evitan el "retorno" de la fase móvil en la dirección no adecuada. Origina un flujo relativamente libre de impulsos.

E.5. Los tres tipos más importantes de bombas de volumen constante basadas en el movimiento de un motor eléctrico. Las de jeringa con fundamento semejante a las de desplazamiento gaseoso, son las que originan un flujo más libre de pulsos. Un cilindro que contiene la fase móvil es recorrido por un pistón a una determinada

velocidad (de gran precisión) mediante el empleo de un sistema de engranajes y un motor de pasos. Los problemas más importantes derivados de su uso son tres:

E.5.1. Alto precio.

E.5.2. Baja capacidad volumétrica para contener la fase móvil (250-500 mL)

E.5.3. Existencia de un tiempo muerto para lograr la constancia del caudal a altas presiones, debido a la compresibilidad de la fase móvil.

Sus ventajas son: Flujo libre de impulsos, puede operar a altas presiones y caudales y son adecuadas para sistemas con gradiente de elusión.

AHUJA, Satinder. Selectivity and Detectability Optimization in HPLC. Vol. in Chemical Analysis Series. Wiley Interscience. U.S.A. 1989. Pag. # 12,13,14,15, de las opciones principales de bombas de alta presión basadas en la acción de un pistón movido mecánicamente a través de una leva excéntrica y un motor eléctrico, la de diafragma es la menos empleada. Un pistón de trabajo origina el vaivén y un pistón flotante amortigua el impacto; su regulación permite seleccionar el caudal. Una cámara con un líquido de alta viscosidad (aceite) es comprimida y mueve un diafragma de acero que separa la cámara cerrada de aceite de la zona de paso del disolvente. Existen dos válvulas (entrada y salida) que realizan la misión de "no retorno". Las bombas más usadas en CLAR son las mecánicas de tipo pistón cuyos elementos básicos son comunes al sincronizado con la acción de

las dos válvulas. El caudal puede regularse cambiando la longitud del pistón o la frecuencia de su movimiento. El flujo que sale es pulsante por la propia naturaleza del movimiento del pistón. Por ello es imprescindible un supresor de pulsos, que se comentará más adelante. Otra forma de evitar las pulsaciones consiste en el empleo de las denominadas bombas de doble pistón o cabeza, que son más caras que las simples pero sus características las hacen muy recomendables en CLAR. Tienen dos cámaras con dos pistones, una leva excéntrica y un motor común, de tal manera que la situación de ambos pistones está desfasada 180° : cuando una cámara está bombeando la otra está en situación de llenado. De esta forma los dos perfiles de flujo (caudal en función del tiempo) se solapan más o menos completamente, originando un flujo constante. También existen bombas de tres cabezas con un desfase de 120° en la situación de los pistones, siendo en este caso el solapamiento de los perfiles más efectivo, aunque el precio se eleve considerablemente.

E.6. Las ventajas más significativas de estas bombas son:

E.6.1. Control estricto de caudal y presión.

E.6.2. Suministro constante de fase móvil.

E.6.3. Fácil cambio de disolvente.

E.6.4. Compatibilidad con sistemas de gradientes de elusión.

E.6.5. Mantenimiento escaso y simple.

La hidrodinámica de un cromatógrafo de líquidos, estrechamente relacionada con el sistema de bombeo, exige una serie de componentes complementarios que eviten perturbaciones (supresor de pulsos, si es preciso), controlen la presión y el caudal y pueden regular el funcionamiento de la(s) bomba(s) para conseguir constancia en el caudal y la presión mediante sistemas electrónicos o informáticos de realimentación (feed-back).

Cuando el flujo es pulsante, es preciso la incorporación de un supresor de pulsos a la salida de la bomba. Su funcionamiento se basa en acumular energía durante la fase de bombeo (pistón avanzado) y desprenderla durante la fase de llenado (pistón retrocediendo) de la bomba. Son muchos los diseños existentes de supresores de pulsos; todos ellos se basan en la compresibilidad de un líquido o un gas encerrado en una cámara y en la flexibilidad del material de un tubo de diseño especial (teflón o acero) con un diseño análogo a la bomba de diafragma pero, lógicamente, sin pistones.

Todos los cromatógrafos de líquidos deben tener un sistema medidor de presión para evitar sobre presiones que podrían dañar al instrumento. Los sistemas más modernos se basan en el empleo de cristales semiconductores cuya resistencia eléctrica es proporcional a la presión a que están sometidos.

El caudal es una variable importantísima en CLAR y puede ser medido a la salida de la bomba o después del detector. Existen dos modelos básicos: el que se basa en la medida de la caída de presión sobre un restrictor de flujo calibrado, y un controlador basado en el control eléctrico de un tubo por el que pasa una burbuja: mide el tiempo que tarda en atravesar una determinada distancia.

F. COLUMNA CROMATOGRÁFICA:

Es la parte esencial del cromatógrafo de líquidos ya que en ella, a través de diferentes mecanismos (adsorción, partición, cambio iónico, exclusión, etc), tiene lugar la separación o discriminación entre analitos e interferentes.

El espectacular aumento de la eficacia cromatográfica de la CLAR respecto a la alternativa clásica se basa en una disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria, lo que implica un aumento de la presión de trabajo. Es condición indispensable para la reproducibilidad de los resultados una gran homogeneidad en la distribución de la fase estacionaria, lo que implica la necesidad de técnicas precisas y complejas de preparación de las columnas: hoy en día se adquieren generalmente en el comercio, que ofrece una variedad amplísima dada la repercusión práctica.

SKOOG, Douglas y LEARY, James. Análisis Instrumental . 4ª Edición. McGraw-Hill. España. 1994. Pág. # 18,19,20,21.dentro de las columnas CLAR convencionales. son la de empaquetamiento de película las primeras que se

usaron. El material (fase estacionaria) consiste en bolitas esféricas regulares (30 – 70 μL) de un sólido no poroso, generalmente vidrio, que están recubiertas de una capa (1 – 3 μm) de material activo cromatográfico poroso, de naturaleza polimérica. Debido a que la densidad de las mismas es elevada, el empaquetamiento uniforme no es técnicamente muy difícil. La distribución cromatográfica entre fase móvil y estacionaria es más asequible que si se tratase de partículas porosas de igual tamaño. No obstante, la capacidad y eficacia de las columnas con este tipo de empaquetamiento en CLAR aumenta considerablemente cuando se sustituye el recubrimiento posterior por un tratamiento especial de las bolitas de vidrio (30 – 60 μm) para que adquieran una microzona porosa externa (1 – 3 μm), también de vidrio, para que pueda actuar de sólido activo en cromatografía de adsorción, o bien como soporte de la fase estacionaria líquida (enlazada o no).

El volumen de poro de estas bolitas es muy pequeño, lo que origina una rápida difusión de los solutos en ambos sentidos, por lo que son adecuadas para cuando se requiere una gran velocidad de determinación.

Sin duda que la sustitución de las partículas con una gran zona inerte por otras porosas y de tamaño considerablemente menor (empaquetamiento microparticulado) comporta importantes ventajas: mayor capacidad y eficacia. No obstante, también conllevan un mayor grado de empaquetamiento, lo que implica un aumento de la presión de trabajo y una gran dificultad de empaquetamiento

adecuado y homogéneo en el laboratorio, por lo que casi siempre se adquieren en el comercio. Al ser el área activa mucho mayor, éstas son aptas para separaciones cromatográficas difíciles y complejas (solutos de propiedades muy parecidas o un elevado número de solutos). Al reducir el tamaño de estas micropartículas porosas, disminuye la profundidad de los poros, por lo que se aumenta la eficacia.

F.1. Según NYDER, Lloyd R. And KIRKLAND, Joseph J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley-Interscience. USA. 1974. Pág. 50-62, 73-79, el concepto de microcolumna en CLAR puede ser engañoso. No se trata de reducir el tamaño de las columnas CLAR convencionales en todas sus dimensiones (longitud y diámetro), sino sólo de una reducción sustancial del diámetro de las mismas y un aumento considerable de la longitud. El término "columnas capilares" sería más correcto y además paralelo al empleado en CG. Novotny, uno de sus inventores, propone la denominación genérica de microcolumna y prefiere emplear el término capilar para un tipo de ellas. Las características técnicas de la CLAR miniaturizada llevada a cabo en la modalidad "microcolumna" son tres:

F.1.1. Pequeño diámetro interno de la columna (0.05 a 1 mm, según tipo).

F.1.2. Gran longitud (20 – 30 m), lo que implica la necesidad de enrollarse en forma de serpentín de configuración ancha.

F.1.3. Pequeño caudal (1 – 50 $\mu\text{L}/\text{min}$).

F.2. Según Novotny son tres las ventajas que comporta el empleo de microcolumnas en CLAR:

F.2.1. Aumento de la eficacia: La AEPT puede reducirse 10^2 a 10^5 veces, lo que las hace especialmente aptas para la separación de mezclas complejas y difíciles.

F.2.2. Reducción drástica del consumo de la fase móvil, cuyo precio es cada día más elevado.

F.2.3. Aumento de la sensibilidad de ciertos detectores especialmente a caudales muy bajos.

F.3. Pueden distinguirse tres tipos básicos de microcolumnas en CLAR. Las características más significativas se comentan a continuación:

F.3.1. Las denominadas "microtubulares abiertas"(según Novotny "verdaderamente capilares") tienen el material activo cromatográfico (líquido depositado mecánicamente o sólido soporte inerte o activo) recubriendo homogéneamente la pared interna de un microtubo (diámetro de $50\ \mu\text{m}$ o menor) de gran longitud.

El adjetivo "abiertas" proviene de que existe una zona una zona central neta libre sin empaquetar. La difusión radial es muy pequeña por lo que la transferencia

másica se favorece considerablemente. El caudal característico de trabajo es de 0,1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

F.3.2. Las microcolumnas denominadas "microcápilares con empaquetamiento parcial" tienen un diámetro interno algo superior a las anteriores (70 μm). Las partículas del sólido activo o soporte (30 μm) no son esféricas y una gran parte de las mismas está retenida mecánicamente en la pared interna, siendo su distribución uniforme a lo largo de la columna. Son típicamente semipermeables.

El caudal de trabajo normal es de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

F.3.3. Las "microcolumnas totalmente empaquetadas" no difieren sustancialmente de la configuración de las columnas CLAR convencionales. Salvo el diámetro pequeño. El caudal ordinario empleado en las mismas es de 40 – 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

F.4. Desde el punto de vista instrumental, la miniaturización en CLAR comporta una serie de requerimientos respecto a las características generales de un cromatógrafo de líquidos descritas anteriormente. Fundamentalmente el diseño del mismo debe adaptarse a la miniaturización y, por tanto, reducirse drásticamente:

F.4.1. El volumen interno del sistema de inyección.

F.4.2. El volumen de la célula de flujo del detector.

F.4.3. Los volúmenes muertos de las conexiones.

Además, las condiciones técnicas son diferentes para cada tipo de microcolumna. Este aspecto ha dificultado el desarrollo y aplicación de la CLAR miniaturizada.

G. SISTEMA DE DETECCIÓN:

Según WESSELY, Karl and ZECH, Karl. High Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analyses. Hewlett Packard. Böblingen. 1979. Pág. # 40-45, 55-59. se trata del módulo del cromatógrafo de líquidos, situado a la salida de la columna, que proporciona de forma continua información acerca de la composición del flujo que circula a su través. Generalmente origina una señal eléctrica continua, que debidamente amplificada y registrada, constituye el denominado cromatograma, del que se extrae información cualitativa y cuantitativa de la muestra inyectada. La existencia de un detector on-line eleva a la categoría de instrumento al cromatógrafo de líquidos.

Según Scott, uno de los factores que han influido en el retraso del desarrollo de la CLAR respecto a la CG está relacionado con el sistema de detección. Las concentraciones bajas de un soluto no modifican sustancialmente las características físicas de la porción de fase móvil que lo contiene (v. i. Densidad, constante dieléctrica, etc) y son indistinguibles respecto a variaciones producidas por el caudal y la temperatura, mientras que en CG pequeñas

concentraciones de un vapor en un gas modifican críticamente las propiedades del mismo.

No existe en la actualidad un detector en CLAR equivalente al detector de ionización de llama en CG. Otra diferencia importante entre los sistemas de detección usados en CLAR y CG consiste en que se trata de adaptaciones a la situación dinámica de principios instrumentales ampliamente desarrollados en instrumentos (fotómetros, fluorímetros, polarógrafos, etc) mediante el empleo de células de flujo, mientras que los empleados en CG tienen en general una concepción y diseño distintos a los instrumentos convencionales. Un aspecto a resaltar es la tendencia actual a incorporar como sistema de detección continua en CLAR instrumentos tales como espectrómetro de masas, RMN, técnicas espectroscópicas atómicas, etc, en la denominada "hibridación instrumental".

G.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES:

Las características ideales que debe poseer un detector continuo empleado para CLAR se resumen a continuación:

G.1.1. Alta sensibilidad (del orden de 10^{-12} – 10^{-11} g/mL) lo que implica un bajo ruido a fondo.

G.1.2. Respuesta universal a todos los solutos, a no ser que se requiera una especificidad hacia determinadas sustancias.

G.1.3. Amplio rango lineal de concentración: entre 5 y 6 órdenes de magnitud.

G.1.4. Volumen mínimo de la célula de flujo, para evitar la dispersión de los solutos.

G.1.5. Debe ser no-destruccion, en caso que se quiera recoger fracciones o se le incorpore una técnica instrumental híbrida para facilitar la identificación.

G.1.6. Insensible a cambios ambientales: presión, caudal, temperatura, etc. Es importante también que sea insensible al cambio de composición de la fase móvil en la modalidad no isocrática.

G.1.7. Debe operar continuamente durante largo tiempo y su empleo debe ser fácil y cómodo para el analista.

G.1.8. Su funcionamiento debe ser asequible a la automatización para incorporarlo a los instrumentos CLAR comandados por un único microprocesador.

El ruido del detector es un aspecto de interés cuando se trabaja a concentraciones bajas del soluto. Se define como la alteración de la línea de base que refleja las variaciones al azar de la señal.

Existen tres tipos de ruido: de periodo corto, de periodo largo y la deriva, según sea la frecuencia de la desviación respecto a la línea de base.

El ruido de periodo corto o de alta frecuencia se define como la máxima amplitud para todas las variaciones positivas o negativas debidas al azar de la señal del detector con una frecuencia mayor que la de un ciclo por minuto; es la media aritmética de las variaciones en cada intervalo tomado menor de un minuto. Su frecuencia es mucho menor que el tiempo de aparición de un pico; generalmente no constituye un problema práctico ya que existen "filtros" electrónicos que lo reducen considerablemente.

El ruido de periodo largo o de baja frecuencia puede ser más problemático; se define como las perturbaciones de la línea de base que tienen una frecuencia similar o menor que la de un pico cromatográfico, por lo que es difícil distinguir la perturbación al azar de una respuesta debida a un soluto a baja concentración. Este tipo de ruido es característico de los detectores muy sensibles a cambios de temperatura, caudal y presión, como los basados en las medidas de los índices de refracción. La deriva es un tipo de ruido caracterizado por una frecuencia muchísimo menor que la de un pico cromatográfico, y se distingue por una desviación global de la línea de base prácticamente lineal hacia valores más altos o más bajos.

H. TIEMPO DE RETENCIÓN (T_R):

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico.

H.1. TIEMPO MUERTO (T_0):

Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien de una muestra similar.

H.2. ANCHURA DE LA BASE DE LAS SEÑALES (W):

Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica. Este valor se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

H.3. NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N):

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

H.4. ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEÓRICO (AEPT):

Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

I. CÁLCULOS MATEMÁTICOS QUE SE EFECTÚAN EN EL ANÁLISIS DE LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA

Primordialmente, lo que se desea obtener en Cromatografía Líquida es la separación de un componente de otro. En otras palabras obtener resolución.

Esto implica la medida de separación de dos componentes. Asumiendo que existe simetría entre los dos picos podemos ampliar el concepto de resolución y encontrar 3 parámetros fundamentales que integran la separación cromatográfica.

I.1. Factor de capacidad:
$$K' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

K' representa la capacidad de la columna. V_0 es el volumen vacío en la columna. V_1 es el primer componente que fue retenido.

Normalmente, una variación en el solvente cambiará el resultado de K' . Para controlar los valores de K' se varía el solvente hasta que la combinación ideal se encuentra.

En caso de dudas, seleccionar un solvente de fuerza intermedia usando fase normal. Si no se obtiene una separación buena; entonces usar fase reversa.

I.1.1. **Fase normal:** Contiene la combinación de empaque polar, solvente no-polar, y muestra polar.

I.1.2. **Fase reversa:** Contiene empaque no-polar, solvente polar, y muestra polar.

I.2. **Factor de separación:**
$$\alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

Es la proporción neta de retención para 2 componentes. Se sustrae el volumen vacío del V_2 y del V_1 también.

Esto lo podemos ver desde un punto de vista diferente.

I.2.1. **Factor de separación:**
$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} \text{ y también } = \frac{\frac{V_2 - V_0}{V_0}}{\frac{V_1 - V_0}{V_0}}$$

Que es lo mismo: $\alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$ como se indico al principio.

Para comparar un pico con otro dividir las K' . Para obtener mejor α alfa: cambie el empaque o la constitución química del solvente.

1.3. Placas teóricas: $N = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2$

La **N** representa el número de placas teóricas, que es el volumen dividido por el ancho y elevado al cuadrado. Multiplicado por 16.

Debemos aclarar que **V** es el volumen, y equivale también al tiempo de retención. O sea, cuanto tiempo toma para que un pico se desarrolle a su máxima altura. Algunas veces notamos se use **T_R** en vez de **V₀**. Que es lo mismo.

N por otra parte se manifiesta como estaciones de separación dentro de la columna. Entre más separación mejor la columna. Si los valores para cromatografía líquida exceden 40,000 placas por metro, entonces la columna se considera como nueva. Si la columna se alarga los valores de **N** aumentan.

La altura de placas teóricas se calcula dividiendo **N** por la longitud de la columna. Este cálculo se usa para comparar la eficiencia entre varias columnas. Los valores normales de Altura de Placas Teóricas (APT) están entre 0.3 y 0.1 mm.

La relación del flujo (velocidad de la fase móvil) y la Altura de Placas Teóricas también nos brindan otro concepto fundamental de separaciones cromatográficas conocido como la relación de Van Deemter. Este concepto puede ser revisado como proyecto adicional, pero no se cubrirá en esta breve presentación.

Las placas teóricas simplemente representan la extensión de las bandas de un pico o través del sistema cromatográfico. Simplemente se establece que: Entre menor la extensión de las bandas de un pico; mejor es el número de placas teóricas.

I.4. También las placas teóricas representan una medida de la calidad del empaque en la columna. Las placas teóricas pueden ser afectadas por:

I.4.1. El tamaño de las partículas del empaque.

I.4.2. La distribución de las partículas.

I.4.3. La forma de las partículas: porosas o pelicular.

J. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Velocidad de análisis	Instrumentación costosa
Alta Resolución	Difícil análisis cualitativo
Resultados cuantitativos	No existe detector universal y sensible
Buena sensibilidad	Elevado costo de operación.
Amplio espectro de aplicación	Experiencia indispensable.

K. EN LA CROMATOGRAFÍA, LOS COMPONENTES QUE SE DESEA SEPARAR:

- K.1. Deben ser solubles en la fase móvil.
- K.2. Deben ser capaces de interactuar con la fase estacionaria, ya sea:
 - K.2.1. Disolviéndose en ella
 - K.2.2. Absorbiéndose
 - K.2.3. Reaccionando con ella en forma química

Como consecuencia, durante la separación los componentes se distribuyen entre ambas fases.

L. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

En este Método se usan columnas de diámetros muy reducido, por ejemplo 2mm, rellenos de materiales especiales pulverulentos, cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30-40 μ m y con frecuencia hasta de 5 - 10 μ m. Este tipo de columnas es muy eficaz y se emplean un sistema de bombeo de alta presión (Hasta 400atm) que haga fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, entre 1 y 10mg.

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

M. MECANISMO DE SEPARACIÓN DE DIFERENTES FORMAS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

Existen cinco métodos o formas de realizar la cromatografía líquida de alta presión, cada uno basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra.

M.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO – LÍQUIDO

Se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria.

Se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo peso molecular es inferior a 1500.

M.2. CROMATOGRAFÍA DE FASE QUÍMICAMENTE UNIDA

Si se altera la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria es posible obtener diferentes tipos de selectividad. Dichos grupos pueden ser de naturaleza polar, como el grupo amino ($-\text{NH}_2$) y el grupo nitrilo ($-\text{CN}$) en el caso de la cromatografía en fase normal, o bien no polar como el grupo octilo ($-\text{C}_8\text{H}_{17}$), octadecilo ($-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$), fenilo ($-\text{C}_6\text{H}_5$), etc., en el caso de la cromatografía de fase inversa.

M.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO – SÓLIDO

El mecanismo de separación, se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido.

M.4 . CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones.

El mecanismo de separación, se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido.

M.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA POR EXCLUSIÓN

Conocida también como cromatografía de permeación o cromatografía de filtración, efectúa la separación de acuerdo con el tamaño de las moléculas.

N. NATURALEZA DE LA FASE MÓVIL

En cromatografía líquida pueden distinguirse dos tipos generales según sea la naturaleza de la fase móvil:

N.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA "NORMAL": En ella la fase móvil es de naturaleza no polar, mientras que la fase estacionaria es fundamentalmente polar. Se denomina así por ser la modalidad que se desarrolló en primer lugar.

la fase móvil, mayor será su poder de elusión. En la modalidad invertida existe una relación inversa entre la polaridad y el poder de elusión de la fase móvil.

No obstante, más trascendente es la selectividad, que se refiere a la capacidad de una fase móvil para provocar una diferenciación en el comportamiento de varios solutos en el sistema cromatográfico: generalmente se consigue con una selección de su composición y si no es suficiente, es precisa una variación de su composición con el tiempo. Cuando se aborden los diferentes tipos de cromatografías, se comentarán extensamente ambas propiedades.

P. LA FASE MÓVIL DEBE POSEER, ADEMÁS, OTRAS PROPIEDADES DESEABLES AUNQUE NO IMPRESCINDIBLES, PARA SU USO EN CLAR:

P.1. Debe tener baja viscosidad, que origina una mayor difusividad mejorando así el funcionamiento de la columna.

P.2. Debe ser asequible en forma pura y evitar así su purificación previa en el laboratorio; dado el gran desarrollo de la CLAR, existe una gran variedad de disolventes comercializados con fines cromatográficos.

P.3. Baja inflamabilidad y toxicidad, requerimiento que no cumplen muchas de las fases móviles usadas; por ello es siempre recomendable una buena ventilación en el laboratorio.

P.4. Baja corrosividad.

P.5. Compatibilidad con el sistema continuo de detección para evitar respuestas anómalas, fenómenos de saturación, etc. Este requisito es muy importante y limitante en la elección de la fase móvil.

Los depósitos que contienen los disolventes no deben tener requisitos especiales. Generalmente están contruidos de vidrio, teflón o acero, según el tipo de disolvente. Tienen una capacidad de 0, 5, a 2 L.

En pocos casos se requiere una termostatación de los mismos: sólo para aplicaciones especiales y cuando el laboratorio no tiene regulada la temperatura ambiente que fluctúa notoriamente, bien durante la jornada o bien entre épocas del año.

Q. UN REQUERIMIENTO TÉCNICO IMPORTANTE DE LA FASE MÓVIL ANTES DE SU INTRODUCCIÓN AL SISTEMA CROMATOGRÁFICO ES LA AUSENCIA DE GASES DISUELTOS QUE PUEDEN ORIGINAR IMPORTANTES PERTURBACIONES:

Q.1. Reacciones indeseables entre los gases (v.i. oxígeno) y los componentes de la muestra.

Q.2. Irregularidades en el flujo dentro de la columna: el gas puede ocupar una zona de la misma de forma temporal o semipermanente, reduciendo así la eficacia del sistema cromatográfico y su reproducibilidad.

Q.3. Fluctuaciones en la respuesta del detector: cambio de línea de base, señales parásitas, etc, ya que pueden producirse burbujas por la reducción drástica de la presión a la salida del cromatógrafo. La desgasificación puede realizarse de forma manual o en aparatos que la llevan a cabo automáticamente y que constituyen un módulo más del cromatógrafo.

R. LOS PROCEDIMIENTOS MÁS USUALES SON:

R.1. Mediante un agitador magnético y un condensador a temperatura ambiente.

R.2. Mediante una bomba de vacío y un calentamiento prolongado.

R.3. Mediante el empleo de ultrasonidos.

R.4. Pasando una corriente de nitrógeno o helio que desplace a otros gases; el helio es una de las mejores alternativas de desgasificación dada su baja solubilidad.

S. FORMACIÓN DE GRADIENTES DE ELUSIÓN

El cambio controlado de la composición de la fase móvil durante el proceso cromatográfico amplía enormemente las posibilidades de la CLAR al obtenerse discriminaciones más efectivas e incluso posibilitar separaciones vedadas cuando se utiliza un sistema isocrático.

Un ejemplo característico se observa cuando, al variar de la elusión isocrática a la elusión con cambio de composición brusca y lineal de la proporción de disolvente desplazante, se obtienen separaciones cromatográficas de mejor calidad.

Los gradientes de elusión pueden ser de varios tipos según se considere el perfil concentración – tiempo. Los más significativos están referidos a la mezcla de dos disolventes, A y B, siendo B el más activo en el desplazamiento de los solutos inicialmente retenidos en la columna cromatográfica. Generalmente, la composición de la fase móvil se expresa en porcentaje de disolvente activo B sobre el diluyente A, salvo en el caso de la cromatografía de cambio iónico que se expresa en concentración iónica o pH. El gradiente más usado en CLAR es el lineal ya que origina una mejor discriminación entre solutos, reflejada en un cromatograma con picos bien resueltos y homogéneamente distribuidos.

T. CARACTERÍSTICAS DE LA FASE MÓVIL

- T.1. Disolver la Muestra
- T.2. No degradar o disolver la fase estacionaria
- T.3. Tener baja viscosidad
- T.4. Ser compatible con el tipo de detector utilizado
- T.5. Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.

U. PROPIEDADES BÁSICAS DE LA FASE MÓVIL SON DOS:

U.1. La fuerza o capacidad de desplazamiento: Es equivalente a la polaridad en el caso de disolventes no electrolíticos.

U.2. La selectividad: Es la capacidad para disolver selectivamente a un compuesto en contraste con otro.

Para determinar la "fuerza" de una mezcla binaria de disolventes se emplea la media aritmética de los factores de peso estadístico de cada disolvente, si, ajustando según su proporción en la mezcla.

Se denominan "Disolventes Isoeluotrópicos" a aquellos que presentan idéntica fuerza de desplazamiento, pero selectividad diferente.

V. ELECCIÓN DEL SOLVENTE

Características:

V.1. Disponible comercialmente

V.2. Precio

V.3. Pureza y Estabilidad

V.4. Disolver la muestra

V.5. Miscible con otros solventes para formar mezclas útiles.

V.6. No degradar o disolver la fase estacionaria.

V.7. Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión.

V.8. Ser compatible con el detector utilizado.

W. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Aguilar G. Alcantara A, García II. Garzón A. Guerrero ME, et al. Validación de métodos analíticos comité de elaboración de guías oficiales de validación de la dirección general de control de insumos para la salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos Biológicos. México, 1992, validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

W.1. En general, se consideran tres tipos de validación a saber:

W.1.1. VALIDACIÓN PROSPECTIVA: Aquella que se realiza a técnicas nuevas.

W.1.2. VALIDACIÓN RETROSPECTIVA: Para técnicas utilizadas repetidamente, no validadas anteriormente y de las que se tiene documentación suficiente para probar la bondad del método.

W.1.3. REVALIDACIÓN: Repetición parcial o total de una validación debido a cambios efectuados en las condiciones originales que puedan afectar la bondad del método validado o cuando el método analítico lleva largo tiempo utilizándose.

El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto.

W.2. La USP XXIII establece que los requisitos necesarios que debe cumplir un método analítico son los siguientes:

W.2.1. Precisión

W.2.2. Exactitud

W.2.3. Límite de detección

W.2.4. Límite de cuantificación

W.2.5. Especificidad

W.2.6. Rango

W.2.7. Linealidad

W.2.8. Tolerancia

w.2.9. Robustez

W.3. Rampazzo, paolo. Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry 1990 . Pág. # 807 - 815. considerando la variedad de ensayos analíticos existentes, se hace necesario establecer categorías para facilitar mejor el estudio y reconocer el tipo de tipo de información que se requiere para la validación de un método analítico.

W.3.1. Categoría 1:

Métodos Analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos (incluyendo los preservativos) en productos farmacéuticos terminados.

W.3.2. Categoría 2:

Métodos Analíticos para la determinación de impurezas o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de limitantes.

W.3.3. Categoría 3:

Métodos analíticos para evaluar las características de las formas farmacéuticas terminadas, tales como disolución o liberación de fármacos.

W.4. LINEALIDAD

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez. Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar.

W.5. PRECISIÓN

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

W.6. EXACTITUD

La Exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero.

Matemáticamente, suele expresarse de los siguientes modos

Desviación : $B = \bar{X} - X$

Desviación Relativa : $B\% = \frac{B}{X} \times 100$

Recuperación : $R = \frac{X}{X} \times 100$

Donde \bar{X} es el valor medio y X el valor verdadero.

De todas ellas, la más utilizada es, sin lugar a dudas, la recuperación. Si bien el valor verdadero de concentración no se conoce sino que sólo puede estimarse, es posible preparar una muestra por un procedimiento más exacto que el evaluado (por pesada, dilución en peso, etc.) y utilizarla como referencia.

Una pendiente significativamente diferente de 1 indica un error proporcional, por ejemplo, debida a la extracción de un porcentaje constante del componente.

Una ordenada al origen significativamente diferente de cero indica un error de tendencia constante y se visualiza como una recta paralela a la teórica, en la cual el valor de la ordenada al origen corresponde a la magnitud del error.

W.7. ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas, etc. Frecuentemente este estudio se realiza retrospectivamente, a partir de los resultados históricos obtenidos en diferentes condiciones, pero en el caso de métodos nuevos, es conveniente que el estudio sea efectuado por el laboratorio emisor de la técnica.

Es evidente que un método debe ser "robusto" (reproducibile) frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien.

Así, es de esperar que la modificación de algún factor, por ejemplo el pH de la fase móvil, produzca en algún caso cambios drásticos en la separación.

cuando los factores a evaluar en el estudio de robustez son muchas, se recurre a un diseño global que permite agruparlos, reduciendo el número de ensayos efectuar.

Es decir, puede estudiarse el efecto producido al cambiar una columna de 6 cm de longitud y 3 μm de diámetro de partículas por una columna de 15 cm y 5 μm (en este caso se intenta estudiar solo una variable, la eficiencia -N-, que puede suponerse a priori aproximadamente igual en una columna corta de diámetro de partícula pequeño y en una más larga, de mayor diámetro de partícula), por variación de dos unidades de pH de la fase móvil, de la concentración de un modificador de fase móvil, etc., sobre los resultados obtenidos: concentración hallada, resolución, asimetría, etc.

X. CRITERIOS DE DETERMINACIÓN

X.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

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

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un

X.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO

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

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (Control de calidad, Estudios de Estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio:

Cantidad adicionada vs. cantidad recuperada: $m \cong 1$ $b \cong 0$

$r \geq 0.98$

Los por cientos recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla de Linealidad del Método.

X.4. EXACTITUD

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

criterio:

El por ciento recuperado y el CV deberán de acuerdo con la tabla I.

Método	Promedio de Recobro	CV
Cromatografía	98 – 102%	≤ 2%

X.5. PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD).

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Criterio:

El CV total debe cumplir con los siguientes criterios.

Método	CV
Cromatográficos	$\leq 2\%$

Nota:

X.5.1. Dependiendo de la naturaleza de la muestra, el CV puede incrementarse.

X.5.2. Si se requiere (n) establecer la(s) fuente(S) de variación del método (lo cual no constituye un requisito mínimo dentro de la validación), realizar otro estudio por ejemplo comparativos.

Y. ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD

Con el método propuesto:

Y.1. Analizar placebos del producto.

Y.2. Identificar la(S) respuesta(S) del (LOS) activos(S), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

Criterio:

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

CAPITULO III. DISEÑO METODOLÓGICO

A. TIPO DE ESTUDIO:

El presente estudio es prospectivo ya que no se encuentra oficialmente publicado por la farmacopea USP XXIV (Farmacopea de los Estados Unidos), propositivo como parte de su utilidad en los analíticos de control de calidad de medicamentos.

B. TIPO DE MUESTREO

Aplicamos la inspección por muestreo aleatorio : únicamente analizamos las unidades de una muestra (un numero reducido de 25 frascos de producto terminado) tomadas de la totalidad de unidades que conforman cada lote muestreado de Noscapina Clorhidrato (Toseba) y de Dextrometorfano Bromhidrato.

C. GENERACIÓN DE INFORMACIÓN

D.1. PRIMARIA

La información primaria fueron libros sobre validación de métodos analíticos, farmacopea de los estados unidos (USP XXIV).

D.2. SECUNDARIA

A través de revistas, libros, Internet, documentos estadísticos y estudios realizados de validación por otros laboratorios tanto nacionales como extranjeros.

E. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

El presente estudio se realizó en PANZYMA LABORATORIES, S.A en el área del departamento de control de calidad, se utilizó cromatografo liquido de alta presión HP1100 el cual fue de gran utilidad para la cuantificación de los principios activos de cada jarabe.

F. FORMA DE RECOLECTAR LOS DATOS.

Se realizaron mediante el esquema de cada ensayo para validación de métodos analíticos.

G. PROCESAMIENTO DE DATOS.

Para el procesamiento de datos obtenidos se utilizó el programa excel en el tratamiento estadístico.

H. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS Y TABLAS

El análisis de los resultados se llevaron a cabo tomando en cuenta cada uno de los criterios de validación.

I. FORMA DE PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

La presentación de los resultados se plasmaron mediante gráficos y tablas.

J. DISEÑO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración de la dilución de

La solución patrón (x) Propiedad media (y)

x_1	y_{11}	y_{12}	y_{13}
x_2	y_{21}	y_{22}	y_{23}
x_3	y_{31}	y_{32}	y_{33}
·	·	·	·
·	·	·	·
x_t	y_{5n}	y_{5n}	y_{5n}

t = número de diluciones.

n = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución, sean equivalentes.

1) Cálculos preliminares para coeficientes de correlación y coeficiente de determinación de la linealidad del sistema:

$$\sum x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\sum y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots \\ \dots + y_{t1} + \dots + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\sum x^2 = n (x^2_1 + x^2_2 + \dots + x^2_t)$$

$$\sum y^2 = y^2_{11} + y^2_{12} + \dots + y^2_{1n} + y^2_{21} + y^2_{22} + \dots + y^2_{2n} + \\ \dots + y^2_{t1} + \dots + y^2_{t2} + \dots + y^2_{tn}$$

$$\sum xy = x_1 (y_{11} + y_{12} + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} \dots)$$

$$+ \dots + x_t (y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

2) Cálculos Finales para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$r = \left[\frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]} \right]^{1/2}$$

3) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación de la linealidad del sistema:

4.1 Calcular para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = \frac{\text{Propiedad Medida (y)}}{\text{Conc. de la dilución de la solución patrón (x)}}$$

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{12} = \frac{y_{12}}{x_1}$$

$$F_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

$$F_{t1} = \frac{y_{t1}}{x_t}$$

$$F_{t2} = \frac{y_{t2}}{x_t}$$

$$F_{tn} = \frac{y_{tn}}{x_t}$$

- 4.2 Calcular la suma de factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor;

$$\sum F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$\sum F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{t1}^2 + F_{t2}^2 + F_{tn}^2$$

$$\bar{F} = \frac{\sum F}{N}$$

Donde: N = número de puntos de la linealidad del sistema.

4) Cálculos finales para el coeficiente de variación de la linealidad del sistema:

$$DE = \left[\frac{N(\sum F^2) - (\sum F)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

$$CV = \frac{DE}{F} \times 100$$

2. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Tabular los resultados.

$$Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_N$$

y = número de lecturas realizadas por la concentración tomada

Cálculos preliminares:

$$\sum Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n$$

$$\sum Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots + Y_n^2$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{N}$$

1) Cálculos Finales del Coeficiente de variación para precisión del sistema:

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

3. LINEALIDAD DEL MÉTODO

A. CANTIDAD ADICIONADA – CANTIDAD RECUPERADA

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Cantidad Adicionada (x)	Cantidad Recuperada (y)
X ₁₁ , X ₁₂ , , X _{1n}	Y ₁₁ , Y ₁₂ , , Y _{1n}
X ₂₁ , X ₂₂ , , X _{2n}	Y ₂₁ , Y ₂₂ , , Y _{2n}
.
X _{t1} , X _{t2} , , X _{tn}	Y _{t1} , Y _{t2} , , Y _{tn}

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

2) Cálculos Preliminares:

$$\sum X = X_{11} + X_{12} + \dots + X_{1n} + X_{21} + X_{22} + \dots + X_{2n} + \dots \\ \dots + X_{t1} + X_{t2} + \dots + X_{tn}$$

$$\sum y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \\ \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\sum X^2 = X^2_{11} + X^2_{12} + \dots + X^2_{1n} + X^2_{21} + X^2_{22} + \dots + X^2_{2n} + \\ \dots + X^2_{t1} + X^2_{t2} + \dots + X^2_{tn}$$

$$\sum y^2 = y^2_{11} + y^2_{12} + \dots + y^2_{1n} + y^2_{21} + y^2_{22} + \dots + y^2_{2n} + \\ \dots + y^2_{t1} + y^2_{t2} + \dots + y^2_{tn}$$

$$\sum xy = X_{11} y_{11} + X_{12} y_{12} + \dots + X_{1n} y_{1n} + X_{21} y_{21} + X_{22} y_{22} + \dots + \\ X_{2n} y_{2n} + \dots + X_{t1} y_{t1} + X_{t2} y_{t2} + \dots + X_{tn} y_{tn}$$

3) Cálculos Finales para el coeficiente de determinación de la linealidad del método:

$$\sum R = R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

$$\sum R^2 = R^2_1, R^2_2, R^2_3, \dots, R^2_n$$

$$R = (\sum R) / N$$

$$DE = \left[\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

3) Cálculos Finales:

Coefficiente de variación:

$$cv = (DE / R) 100$$

4. EXACTITUD DEL MÉTODO

1. Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R), con base al siguiente formato:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

R = Concentración obtenida de las replicas.

N = Número total de lecturas o concentración obtenida

2. Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_N$$

$$\sum R^2 = R^2_1, R^2_2, R^2_3, \dots, R^2_N$$

$$R = \frac{\sum R}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

1. Cálculos Finales del Coeficiente de Variación de la exactitud del método.

$$Cv = (DE / R) 100$$

5. PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD) DEL MÉTODO

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

Cuando se utilicen un número distinto de días y/o analistas y/o recobros por analista y día, se sugiere que se consulte a un estadístico.

1. Tabular los resultados con base en el siguiente formato:

ANALISTA			
		1	2
Día	1	y_{111}	y_{211}
		y_{112}	y_{212}
		y_{113}	y_{213}
	2	y_{121}	y_{221}
		y_{122}	y_{222}
		y_{123}	y_{223}

2. Cálculos preliminares:

$$\Sigma y \dots = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{123} + y_{211} +$$

$$y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\Sigma y^2 \dots = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 +$$

$$y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$y = \frac{\Sigma y}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N(\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

N = número total de determinaciones, en este caso específico N = 12).

Cálculos Finales del Coeficiente de variación de la precisión y

reproducibilidad del método: $Cv = (DE / y) 100$

K. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLE

K.1. OBJETIVO # 1

Validar un método analítico cromatográfico para antitusivos que sirva de guía al CONTROL DE CALIDAD de laboratorios panzyna.

VARIABLE	DEFINICIÓN	MÉTODO	PONDERACIÓN O INDICADOR
Validación de un Método de análisis por HPLC para antitusivos.	Desarrollar la metodología analítica	Cromatografía Líquida de alta Presión (HPLC)	Determinación cuantitativa de: Noscapina HCL Dextrometorfano HBr

K. 2. OBJETIVO #2

Optimizar la fase móvil mediante la linealidad del método analítico.

VARIABLE	DEFINICIÓN	MÉTODO	PONDERACIÓN O INDICADOR
Optimización de Fase móvil del método	Preparación de una fase móvil adecuada	Acetonitrilo : Agua: Trietilamina	(500:500:4) Ajustar PH: 3.0 ±0.1 con Acido fosfórico

K.3. OBJETIVO # 3

Aplicar los criterios de validación analítica aplicada a la determinación cuantitativa de drogas antitusivas.

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADOR	TECNICA	INSTRUMENTO
Linealidad del sistema	Proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta.	$R > 0.99$ $r^2 > 0.98$ $CV \leq 1.5\%$	Programa de excel	Computadora DATATEX
Presición	Relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central.	$CV \leq 1.5\%$	Programa excel	Computadora DATATEX
Linealidad del método	La capacidad para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito (cantidad) en la muestra.	$b=0$ $m= 1$ $r^2 > 0.98$ $CV < 3\%$	Programa excel	Computadora DATATEX

Continuación del objetivo, aplicar los criterios de validación al método de validación

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADOR	TECNICA	INSTRUMENTO
Exactitud	Proximidad de los resultados de prueba obtenidos por ese método al valor verdadero	$CV \leq 1.5\%$	Programa de excel	Computadora DATATEX Computadora DATATEX
Robustez	Medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas.		Programa excel	Computadora DATATEX

OBJETIVO PROPOSITIVO.

Desarrollar método válido, reproducible y confiable que sea adecuado para el análisis de antitusivos en laboratorio panzma.

VARIABLE	DEFINICIÓN	MÉTODO	PONDERACIÓN O INDICADOR
Desarrollar métodos validados para el análisis de antitusivos	Método para determinar la cantidad verdadera de principio activo que tiene el medicamento en el momento de su fabricación.	Análisis cromatográfico	Determinación de la cantidad en miligramos que tiene el medicamento de acuerdo a lo declarado en la etiqueta

L. MATERIALES Y MÉTODOS

L.1 MATERIAL

a) Reactivos:

i) Solventes:

- Acetonitrilo grado HPLC
- Trietilamina grado HPLC
- Acido fosfórico grado análisis
- Agua destilada

Los reactivos acetonitrilo, trietilamina y agua se utilizaron para la elaboración de la fase móvil en la validación de un método analítico, al ácido fosfórico para ajustar PH de la fase móvil.

ii) Estándares y Muestras:

- Noscapina Clorhidrato de
- Dextrometorfano Bromhidrato de

Estos son los estándares que se utilizaron para la determinación cuantitativa de los productos terminados en la validación del método analítico.

2) EQUIPOS.

a. Equipos de cristalería:

- Matraz volumétrico vidrio pirex clase A de 10, 25, 50 y 100ml.
- Pipetas volumétricas vidrio pirex clase A de 1, 2, 4, 5, 10 y 25ml.

Los matraces volumétricos y las pipetas volumétricas son utilizadas para realizar las diluciones a diferentes concentraciones de estándares y producto terminado..

b. EQUIPOS INSTRUMENTALES

- Agitador magnético.
- Sistema cromatográfico equipado con detector de longitud de onda variable y columna spherisorb RP18 250 x 4mm, 5micrones.
- Calculadora estadística científica, Canon F-802P.
- Programa de estadística excel.

El sistema cromatográfico sirve para el análisis de multi componentes presentes en un medicamento.

El programa estadístico es para la determinación de las diferentes variables de validación como linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud y repetibilidad, precisión (reproducibilidad al 100%)

CAPITULO IV . PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS

A. MÉTODO VALIDADO DE : DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO

1. Equipos y Reactivos

Equipos

- Material de vidrio Pyrex perfectamente limpios y secos.
- Balanza analítica OHAUS calibrada.
- Baño de Ultrasonico.
- Sistema de microfiltración: Membrana de nylon 30mm, 0.20µm.
- Membrana millipore nypor código ZDMN142 – 020AY.
- Spherisorb 250 x 2mm, 5µm. Hewlet Packard.
- Cromatógrafo Líquido Hewlet Packard, modelo 1100.
- Inyector manual 7725.
- Bomba, marca Hewlet Packard modelo 1100.
- Monitor Markvision.
- Procesador Datatex AMDK62 450 MHZ.

Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC.
- Agua Destilada.
- Trietilamina grado HPLC.
- Ácido ortofosfórico 89%.

3. Soluciones

Fase Móvil: Prepare una mezcla filtrada y desgasificada de Acetonitrilo: Agua: Trietilamina (500:500:4). Ajuste con ácido ortofosfórico hasta $\text{Ph} = 3.5 \pm 0.05$.

Solución Estándar: Pesar exactamente la cantidad de 15mg de Dextrometorfano Bromhidrato transferirlo a un volumétrico de 100ml, adicione fase móvil hasta aforar, mezcle en ultrasónico, de esta dilución tome 5ml adicione en volumétrico de 50ml afore al volumen con fase móvil, agite en baño ultrasónico. La concentración final obtenida es de 15mcg /ml.

Solución Muestra: Tome la cantidad de 10ml transfiera a un volumétrico de 50ml, afore con fase móvil agite en baño ultrasónico, de esta dilución tome 5ml y transfiera a un volumétrico de 100ml afore al volumen, agite con baño ultrasónico, la concentración final obtenida es de 15mcg /ml.

3. Procedimiento

3.1 Sistema cromatográfico

- Columna Spherisorb ODS 1.
- Fase móvil (Acetonitrilo: Agua: Trietilamina) 500 : 500 : 4
- Velocidad de flujo 1ml/Minuto.
- Volumen de Inyección 20 μ L
- Modo de Integración Área

• Detección	275nm.
• Detector de longitud de onda	Variable
• Tiempo de retención	4.6 Minutos
• Tiempo total de análisis	10 Minutos
• Atenuación	0
• Presión	170 Bar

3.2 Acondicionar la columna con fase móvil durante 30 minutos previos a su uso o hasta obtener una línea base estable. Inyectar la solución estándar repetidas veces el coeficiente de variación (C.V) no debe ser mayor del 2%, Inyectar la solución de la muestra por duplicado y determinar el contenido de Dextrometorfano Bromhidrato, para asegurar la estabilidad del sistema, inyectar el estándar después de seis inyecciones de muestra.

3.3 Condiciones de lavado: Lavar la columna y el equipo haciendo pasar Agua destilada por 10 minutos, luego hacer pasar 100ml de una mezcla de Agua: Metanol (50:50).

3.4 Cálculos: Calcular el contenido de Dextrometorfano Bromhidrato de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = Concentración de la muestra.

A_m = Área de la muestra.

C_p = Concentración del patrón.

A_p = Área del Patrón.

3.4. MÉTODO VALIDADO DE : NOSCAPINA CLORHIDRATO

1. Equipos y Reactivos

Equipos

- Material de vidrio Pyrex perfectamente limpios y secos.
- Balanza analítica OHAUS calibrada.
- Baño de Ultrasonico.
- Sistema de microfiltración: Membrana de nylon 30mm, 0.20µm.
- Membrana millipore nypor código ZDMN142 – 020AY.
- Spherisorb 250 x 2mm, 5µm. Hewlet Packard.
- Cromatógrafo Líquido Hewlet Packard, modelo 1100.
- Inyector manual 7725.
- Bomba, marca Helewt Packard modelo 1100.
- Monitor Markvision.
- Procesador Datatex AMDK62 450 MHZ.

Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC.
- Agua Destilada.
- Trietilamina grado HPLC.
- Ácido ortofosfórico 89% grado análisis.

2. Soluciones

Fase Móvil: Prepare una mezcla filtrada y desgasificada de cetonitrilo: Agua: Trietilamina (500:500:4). Ajuste con ácido ortofosfórico hasta $\text{PH} = 3.5 \pm 0.05$.

Solución Estándar: Pesar exactamente la cantidad de 15mg de Noscapina HCL transferirlo a un volumétrico de 100ml, adicione fase móvil hasta aforar, mezcle en ultrasónico, de esta dilución tome 5ml adicione en volumétrico de 50ml afore al volumen con fase móvil, agite en baño ultrasónico. La concentración final obtenida es de 15mcg /ml.

Solución Muestra: Tome la cantidad de 5ml de jarabe de Noscapina Clorhidrato transfiera a un volumétrico de 100ml, afore con fase móvil agite en baño ultrasónico, de esta dilución tome 5ml y transfiera a un volumétrico de 50ml afore al volumen, agite con baño ultrasónico, la concentración final obtenida es de 15mcg /ml.

3.5 Procedimiento

3.1 Sistema Cromatográfico

- Columna Spherisorb ODS 1.
- Fase móvil (Acetonitrilo: Agua: Trietilamina) 500 : 500 : 4.
- Velocidad de flujo 1ml/Minuto.

• Volumen de Inyección	20µL
• Modo de Integración	Área
• Detección	312nm.
• Detector de longitud de onda	Variable
• Tiempo de retención	3.4 Minutos
• Tiempo total de análisis	10 Minutos
• Atenuación	0
• Presión	170 Bar

3.6 Acondicionar la columna con fase móvil durante 30 minutos previos a su uso o hasta obtener una línea base estable. Inyectar la solución estándar repetidas veces el coeficiente de variación (C.V) no debe ser mayor del 2%, Inyectar la solución de la muestra por duplicado y determinar el contenido de Noscipina Clorhidrato, para asegurar la estabilidad del sistema, inyectar el estándar después de seis inyecciones de muestra.

3.7 Condiciones de lavado: Lavar la columna y el equipo haciendo pasar Agua destilada por 10 minutos, luego hacer pasar 100ml de una mezcla de Agua: Metanol (50:50).

3.8 Cálculos: Calcular el contenido de Noscipina Clorhidrato de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = Concentración de la muestra.

A_m = Área de la muestra.

C_p = Concentración del patrón.

A_p = Área del Patrón.

B. APLICACIÓN DE LOS CRITERIOS DE VALIDACIÓN

B.1 Linealidad del sistema para Noscapina Clorhidrato estándar por cromatografía Líquida de alta presión

La linealidad del sistema para Noscapina Clorhidrato se demostró inyectando cinco concentraciones diferentes de la solución estándar en el rango de 25% a 125% (15mcg/ml) para los jarabes utilizados. Se duplicaron las inyecciones del estándar en el cromatografo liquido de alta presión.

En la tabla 1. de la linealidad del sistema se esquematizó la cantidad de X para la concentración en microgramos por mililitros, se esquematizo Y dos veces que significan las lecturas que se realizaron por cada dilución.

- 1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

TABLA 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA DE: NOSCAPINA CLORHIDRATO

Concentración de la dilución de la solución patrón (x) mcg/ml	Propiedad medida (y)	
	Area	
3	8376	8407
7	16891	16856
11	25438	25493
15	33768	33814
19	41888	41818

La respuesta del detector fue lineal para el rango completo de concentraciones con un coeficiente de correlación $r = 0.99$ (criterio de aceptación > 0.99) como se ilustra en la tabla 1A. lo cual significa el grado de correlación que existe entre cada una de las lecturas obtenidas por cada concentración por lo que se cumple con este criterio.

El coeficiente de determinación $r^2 = 0.9998$ (criterio de aceptación

$r^2 > 0.98$) lo que nos indica que existe concordancia entre los resultados obtenidos con respecto a la cantidad adicionada de cada concentración por lo que se cumple con este criterio.

El coeficiente de variación obtenido de 0.5% en la linealidad del sistema se encuentra del rango de aceptación que debe ser menor del 1.5% lo cual nos permite evaluar la incertidumbre, es decir la dispersión de los datos alrededor a la media en este caso se determina que el grado de dispersión es pequeño por lo que decimos que tenemos una respuesta lineal lo que significa que los puntos en la recta no varían considerablemente como se demuestra en el grafico.1.

TABLA 1 A . RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA NOSCAPINA CLORHIDRATO

Coeficiente de Correlación:	0.9999
Coeficiente Determinación:	0.9998
Promedio:	2106.7
Coeficiente de Variación:	0.5%

GRAFICO 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA DE NOSCAPINA CLORHIDRATO
SOLUCIÓN ESTÁNDAR

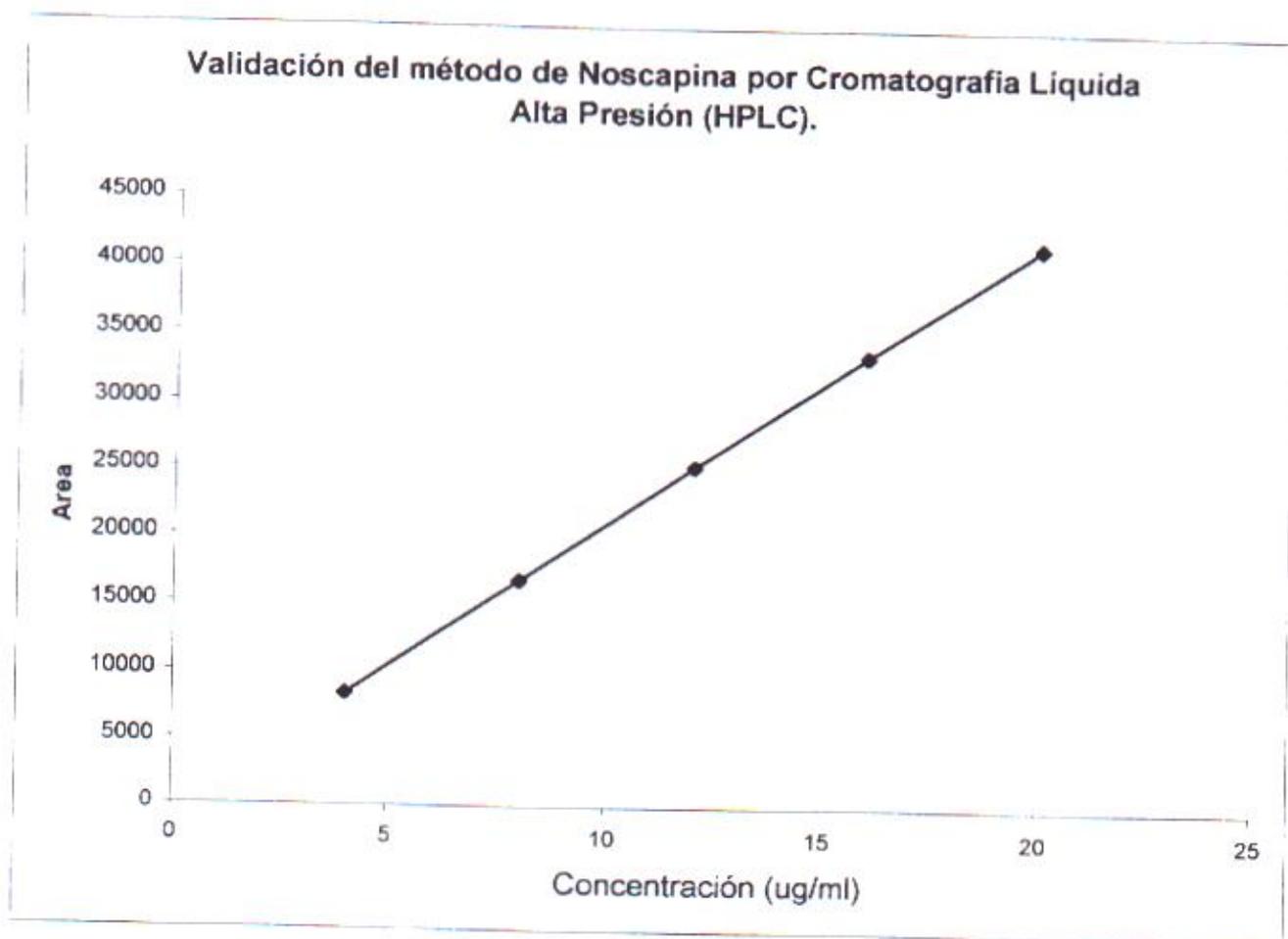


TABLA 2. PRECISIÓN DEL SISTEMA DE: TOSEBA (NOSCAPINA CLORHIDRATO)

Número de Lecturas	Propiedad Medida Area (y)
1	33827
2	33822
3	33886
4	33831
5	34023
6	33814

La precisión del sistema para la Noscapina Clorhidrato se demostró inyectando el mismo nivel de concentración (15mcg/ml) de la solución estándar por seis veces consecutivas, esta se llevo a efecto pesando seis veces el estándar realizándose el mismo numero de diluciones y posteriormente se inyecto en el cromatógrafo liquido de alta presión, se obtuvo un coeficiente de variación de 0.2% lo que es indicativo de la poca variación de los resultado existiendo una buena repetibilidad de la respuesta.

TABLA 2 A : RESULTADO DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA ESTÁNDAR DE NOSCAPINA CLORHIDRATO

Promedio:	33867
Coeficiente de Variación:	0.2%

TABLA 3. LINEALIDAD DEL MÉTODO DE: TOSEBA
(NOSCAPINA CLORHIDRATO)

CONCENTRACION	Adicionada	mcg/ml	mcg/ml
11	12.04	12.10	12.02
15	15.99	16.08	16.02
19	19.98	20.06	20.02

La linealidad del método para jarabe de Noscapina Clorhidrato se demostró en los jarabe tomando concentraciones entra el rango comprendido entre 75% a 125% como se ilustra en la tabla 3, tomando como valor central (15 mcg/ml). Cada concentración se inyectó por duplicado en el cromatógrafo líquido de alta presión.

En la tabla 3 A de los resultados de la linealidad del método, la respuesta fue lineal durante todo el rango de concentraciones con un coeficiente de determinación de 0.99 el cual nos indica el grado de concordancia existente entre la cantidad

adicionada y la cantidad recuperada por cada concentración.

La pendiente obtenida 0.99 nos indica la sensibilidad analítica lo cual nos indica que la recta es perpendicular y existe una proporción entre el eje de las x y el eje de la y por el origen por lo que el método se considera lineal.

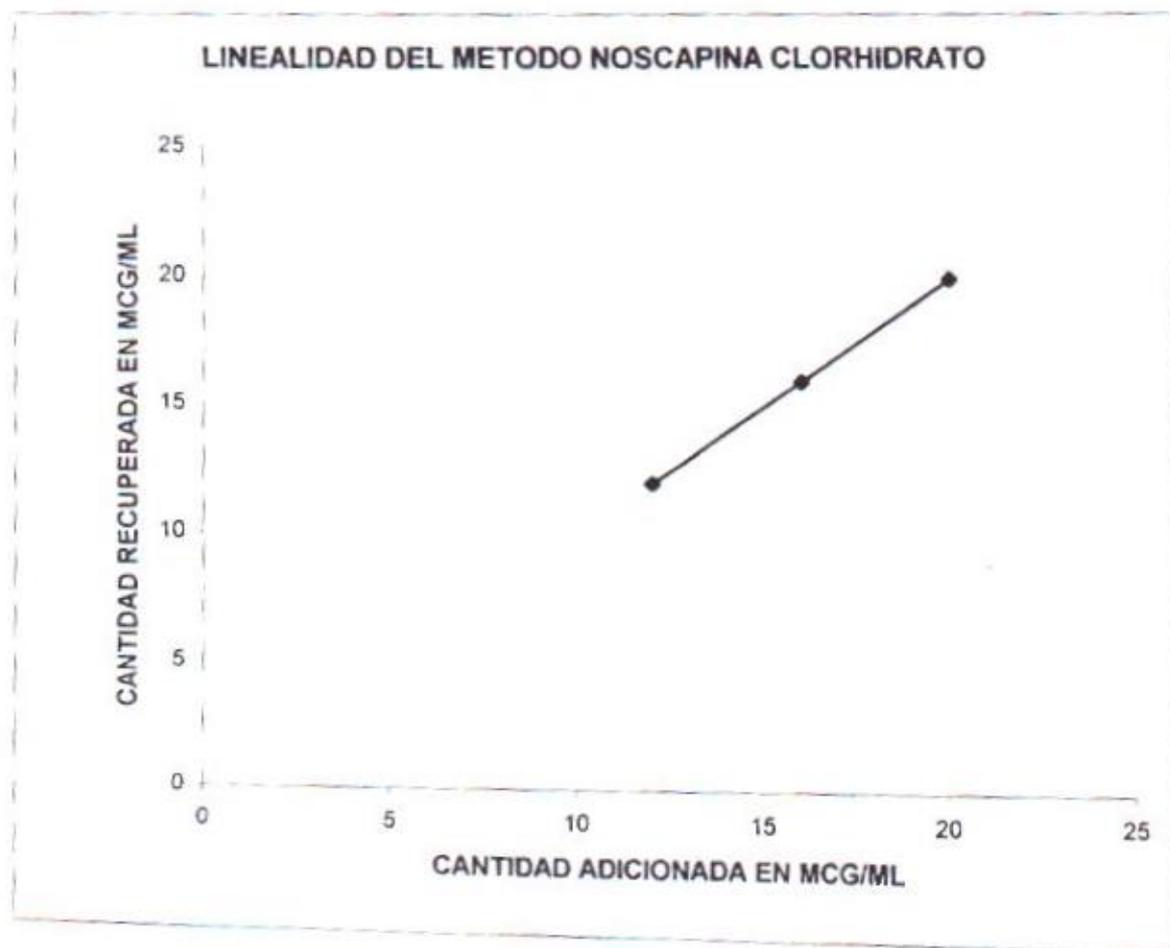
El intercepto obtenido aproximadamente igual a cero nos indica que en el método no existen interferencias considerables que puedan afectar la respuesta obtenida mediante el uso de procedimientos establecidos en la cuantificación del analito, a pesar de no extraerse el principio activo.

El coeficiente de variación obtenido de 0.2% es un indicativo de la pequeña variación de la respuesta obtenida aun teniendo presente excipiente que pueden contribuir en las interferencias, durante la cuantificación, no existe una variación considerable por tanto podemos decir que la respuesta es lineal en toda la proporción de las concentraciones tomadas.

TABLA 3 A: RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA LA NOSCAPINA CLORHIDRATO

Promedio :	100.26
Pendiente :	0.9966
Intercepto:	0.09
Coefficiente Correlación:	0.9999
Coefficiente Determinación:	0.9999
Coefficiente de Variación	0.2

GRAFICO 2. LINEALIDAD DEI METODO DE NOSCAPINA CLORHIDRATO EN JARABE



**TABLA 4. EXACTITUD DEL METODO
TOSEBA (NOSCAPINA CLRHIDRATO)**

MUESTRA	% DE RECOBRO	
	REPLICA 1	REPLICA 2
1	99.84	99.92
2	100.70	99.80
3	100.02	99.88
4	100.50	99.85
5	99.85	99.82
6	99.86	99.83

El coeficiente de variación obtenido de 0.2% nos indica que existe una pequeña variación en las respuestas y el método se considera exacto por lo que es capaz de dar resultados esperados con respecto a la concentración adicionada.

**TABLA 4 A: RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO DE LA
NOSCAPINA CLORHIDRATO**

Promedio:	99.9%
Coefficiente de Variación:	0.2%

**TABLA 5. DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)
TOSEBA (NOSCAPINA CLORHIDRATO)**

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen dos días, dos analistas y tres determinaciones.

DIAS	ANALISTA	
	1	2
1	99.99%	99.51%
	99.91%	99.22%
	99.56%	100.29%
2	99.16%	99.71%
	99.13%	99.45%
	99.32%	99.55%

La precisión y reproducibilidad se demostró midiendo el efecto de diferentes días y analistas que se tuvieron en el método. La precisión y reproducibilidad del método de cuantificación se lleva a efecto obteniéndose resultados de un coeficiente de variación de 0.3 lo cual no afecta la reproducibilidad de la respuesta y que el grado de dispersión con respecto a la media es sumamente pequeño.

TABLA 5 A: RESULTADOS DE LA PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DE LA NOSCAPINA CLORHIDRATO

Promedio:	100.1
Coeficiente de Variación:	0.3

TABLA 6 : ESTABILIDAD DE LA SOLUCION ESTANDAR DE NOSCAPINA CLORHIDRATO EN LA FASE MOVIL

DIA	SOLUCION ESTANDAR CONCENTRACIÓN DE 16MCG/ML
0	99.8%
1	99.60%
3	99.65%
6	99.50%

Lo demostrado en la tabla 6 es que la concentración se mantuvo dentro de un porcentaje aceptable, lo que es de gran importancia ya que nos aseguramos que podemos realizar el análisis en el transcurso de 8 horas si fuese necesario sin que la Noscapina Clorhidrato sufra cambios. Además la estabilidad en la fase móvil es importante conocerla por si existe inconveniente en el tiempo y así asegurarse que se puede analizar con el tiempo con la seguridad de obtener resultados confiables.

C. ESPECIFICIDAD DEL METODO

Se prepararon y analizaron muestras y materia prima a los que se les adiciono peroxido de hidrógeno y se sometió a 50 grados centígrados por un día, posteriormente se analizo, el método es específico ya que los picos de los excipientes y los de degradación no interfieren en la noscapina. Ver anexo.

Tabla 7. ROBUSTEZ NOSCAPINA CLORHIDRATO

Condición Fase Móvil [A:B:C]	Desviación Estándar	Factor de coleo %	Noscapia Clorhidrato
520:520:4.16	0.56%	1.3	99.85%
500:500:4	0.52%	1.4	99.80%
480:480:3.84	0.53%	1.3	99.92%

D. LINEALIDAD DEL SISTEMA DE: DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO

D.1. Linealidad del sistema para Dextrometorfano Bromhidrato estándar por cromatografía Líquida de alta presión

La linealidad del sistema para Dextrometorfano Bromhidrato se demostró inyectando cinco concentraciones diferentes de la solución estándar en el rango de 25% a 125% (15mcg/ml) para los jarabes utilizados. Se duplicaron las inyecciones del estándar en el cromatógrafo líquido de alta presión.

En la tabla 8. de la linealidad del sistema se esquematizó la cantidad de X para la concentración en microgramos por mililitros, se esquematizo Y dos veces que significan las lecturas que se realizaron por cada dilución.

2) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

**TABLA 8. LINEALIDAD DEL SISTEMA DE: DEXTROMETORFANO
BROMHIDRATO**

Concentración de la dilución de la solución patrón (x) mcg/ml	Propiedad medida (y) Area	
3	4995	4998
7	10090	10100
11	15165	15178
15	20247	20237
19	25279	25279

La respuesta del detector fue lineal para el rango completo de concentraciones con un coeficiente de correlación $r = 0.9$ (criterio de aceptación > 0.99) como se ilustra en la tabla 8A, lo cual significa el grado de correlación que existe entre cada una de las lecturas obtenidas por cada concentración por lo que se cumple con este criterio.

GRAFICO 3. LINEALIDAD DEL SISTEMA DE DEXTROMETORFANO
BROMHIDRATO SOLUCIÓN ESTÁNDAR

LINEALIDAD DEL SISTEMA

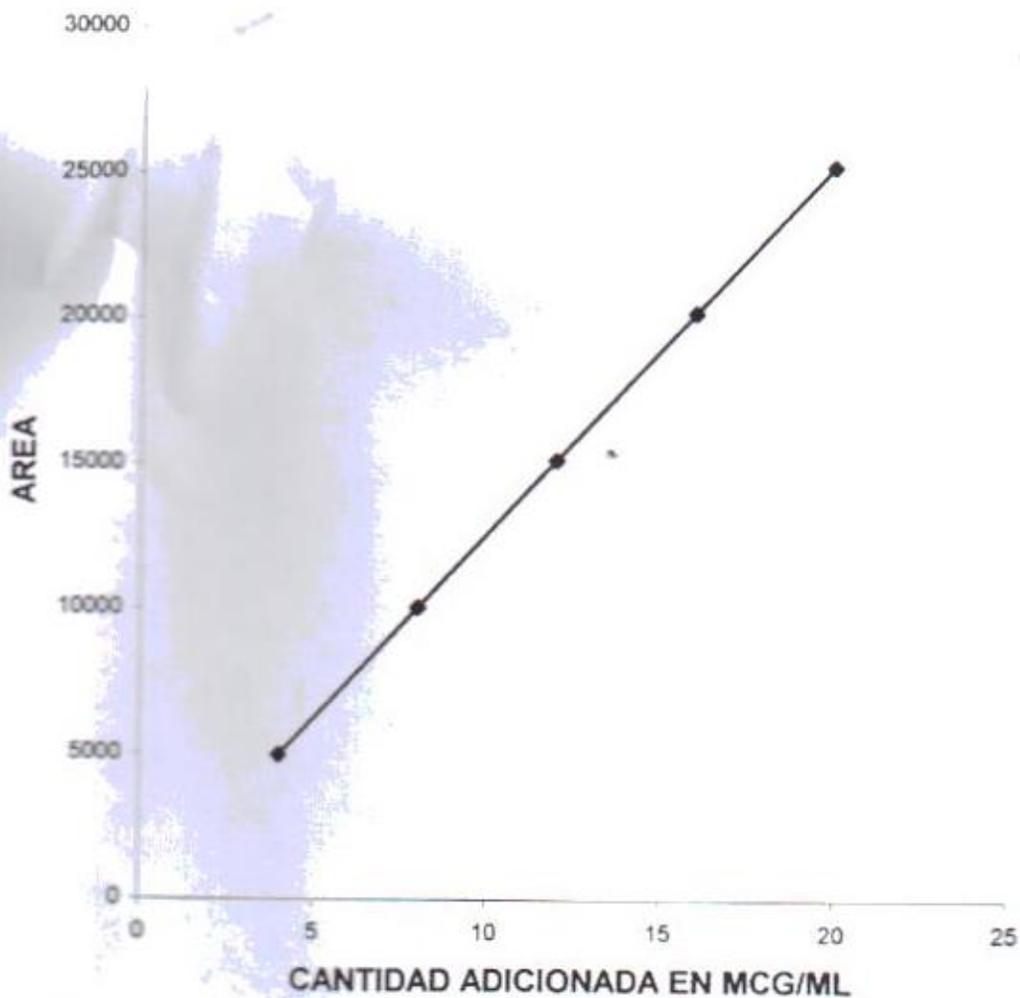


TABLA 9. PRECISIÓN DEL SISTEMA DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO

Número de Lecturas	Propiedad Medida Area (y)
1	20233
2	20216
3	20329
4	20258
5	20220
6	20230

La precisión del sistema para el Dextrometorfano Bromhidrato se demostró inyectando el mismo nivel de concentración (15mcg/ml) de la solución estándar por seis veces consecutivas, esta se llevo a efecto pesando seis veces el estándar realizándose el mismo numero de diluciones y posteriormente se inyecto en el cromatógrafo liquido de alta presión, se obtuvo un coeficiente de variación de 0.2% lo que es indicativo de la poca variación de los resultado existiendo una buena repetibilidad de la respuesta.

**TABLA 10. LINEALIDAD DEL MÉTODO DEXTROMETORFANO
BROMHIDRATO**

Concentración Adicionada mcg/ml	CONCENTRACIÓN RECUPERADA mcg/ml		
	11	12.10	11.97
15	16.10	16.01	16.07
19	20.05	20.12	20.01

La linealidad del método para jarabe de Dextrometorfano Bromhidrato se demostró en los jarabe tomando concentraciones entra el rango comprendido entre 75% a 125% como se ilustra en la tabla 10, tomando como valor central (15mcg/ml). Cada concentración se inyectó por duplicado en el cromatógrafo líquido de alta presión.

En la tabla 10 A de los resultados de la linealidad del método, la respuesta fue lineal durante todo el rango de concentraciones con un coeficiente de determinación de 0.99 el cual nos indica el grado de concordancia existente entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada por cada concentración.

La pendiente obtenida 1 nos indica la sensibilidad analítica lo cual nos indica que la recta es perpendicular y existe una proporción entre el eje de las x y el eje de la y por el origen por lo que el método se considera lineal.

El intercepto obtenido aproximadamente igual a cero nos indica que en el método no existen interferencias considerables que puedan afectar la respuesta obtenida mediante el uso de procedimientos establecidos en la cuantificación del analito, a pesar de no extraerse el principio activo.

El coeficiente de variación obtenido de 0.3% es un indicativo de la pequeña variación de la respuesta obtenida aun teniendo presente excipiente que pueden contribuir en las interferencias, durante la cuantificación, no existe una variación considerable por tanto podemos decir que la respuesta es lineal en toda la proporción de las concentraciones tomadas.

TABLA 10 A: RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA LA NOSCAPINA CLORHIDRATO

Promedio :	100.3%
Pendiente :	1.0
Intercepto:	0.03
Coeficiente Determinación:	0.9998
Coeficiente de Variación	0.3%

GRAFICO 4. LINEALIDAD DEL MÉTODO DE DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO JARABE

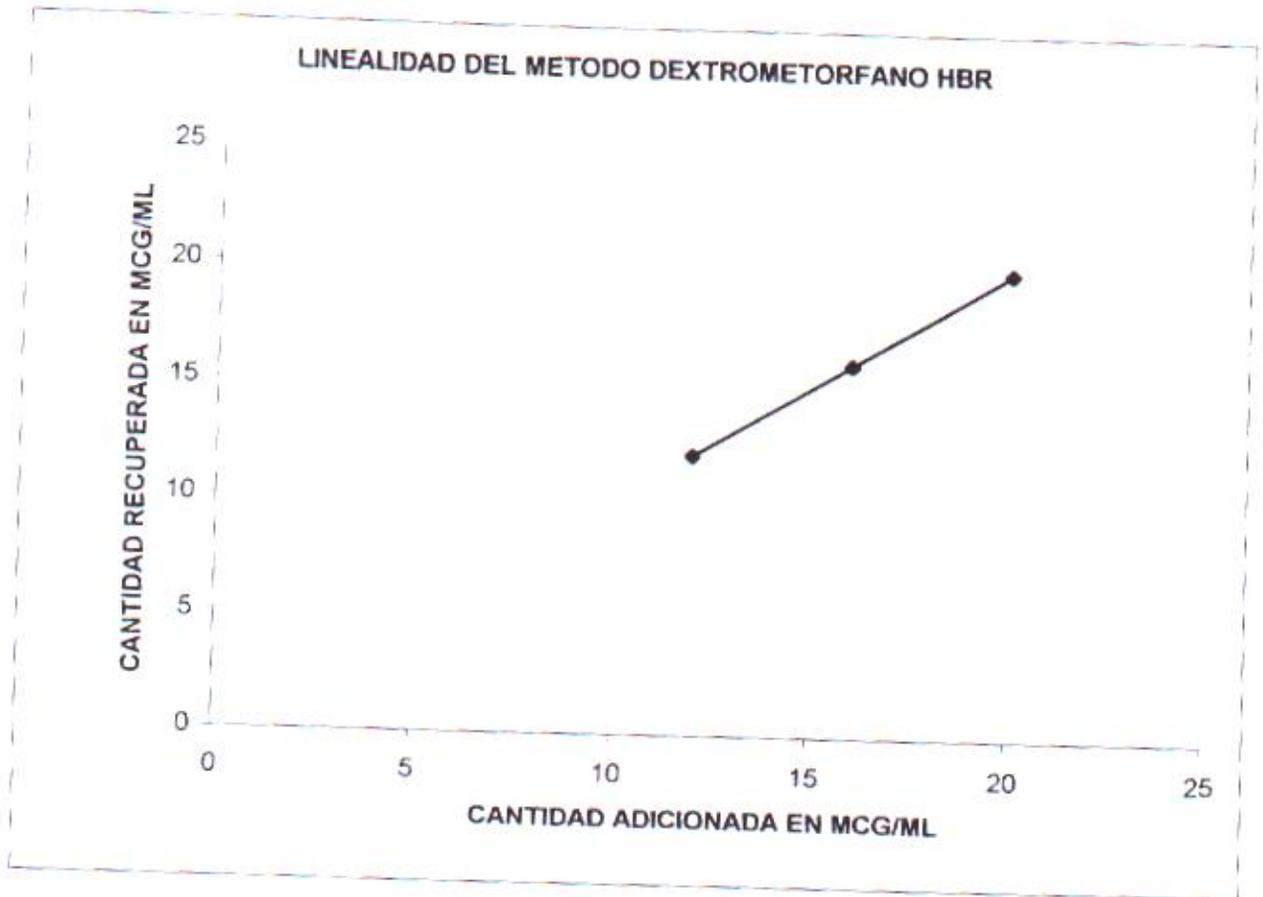


TABLA 11. EXACTITUD DEL METODO DE
DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO

MUESTRA	% DE RECOBRO	
	REPLICA 1	REPLICA 2
1	98.59	98.62
2	99.40	99.35
3	99.44	99.42
4	98.93	98.90
5	98.93	98.95
6	98.30	98.35

El coeficiente de variación obtenido de 0.4% nos indica que existe una pequeña variación en las respuestas y el método se considera exacto por lo que es capaz de dar resultados esperados con respecto a la concentración adicionada.

TABLA 11 A: RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO DE EL
DXTROMETORFANO BROMHIDRATO.

Promedio:	98.9%
Coefficiente de Variación:	0.4%

**TABLA 12. DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)
DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO.**

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen dos días, dos analistas y tres determinaciones.

DIAS	ANALISTA	
	1	98.4
98.3		98.2
99.2		97.8
2	98.4	99.2
	98.4	99.2
	98.9	98.7

La precisión y reproducibilidad se demostró midiendo el efecto de diferentes días y analistas que se tuvieron en el método. La precisión y reproducibilidad del método de cuantificación se lleva a efecto obteniéndose resultados de un coeficiente de variación de 0.5% lo cual no afecta la reproducibilidad de la respuesta y que el grado de dispersión con respecto a la media es sumamente pequeño.

TABLA 12 A: RESULTADOS DE LA PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DE LA DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO.

Promedio:	98.7
Coefficiente de Variación:	0.5%

TABLA 13 : ESTABILIDAD DE LA SOLUCION ESTANDAR DE DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO. EN LA FASE MOVIL.

DIA	SOLUCION ESTANDAR CONCENTRACIÓN DE 16MCG/ML
0	99.8%
1	99.60%
3	99.65%
6	99.50%

Lo demostrado en la tabla 13 es que la concentración se mantuvo dentro de un porcentaje aceptable, lo que es de gran importancia ya que nos aseguramos que podemos realizar el análisis en el transcurso de 8 horas si fuese necesario sin que el dextrometorfano Bromhidrato. sufra cambios. Además la estabilidad en la fase móvil es importante conocerla por si existe inconveniente en el tiempo y así asegurarse que se puede analizar con el tiempo con la seguridad de obtener resultados confiables.

E. ESPECIFICIDAD DEL METODO

Se prepararon y analizaron muestras y materia prima a los que se les adiciono peroxido de hidrógeno y se sometió a 50 grados centígrados por un día, posteriormente se analizo, el método es específico ya que los picos de los excipientes y los de degradación no interfieren en la dextrometorfano. Ver anexo.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

1. En la optimización de la fase móvil se utilizó Acetonitrilo:agua:Trietanolamina obteniendo mejor solubilidad de la molécula con un tiempo de retención mas corto.
2. Se establecieron las condiciones de validación para la determinación cuantitativa de las drogas antitusivas Noscapina Clorhidrato y Dextrometorfano Bromhidrato, para cada análisis realizado en el estudio.
3. El método validado es reproducible y confiable por lo que se puede utilizar en el análisis de antitusivos que se tengan en su constitución noscapina HCL y Dextrometorfano HBr.

CAPITULO V. RECOMENDACIONES

- Validar nuevos métodos de análisis para antitusivos por cromatografía líquida de alta presión utilizando diferentes fases móviles.
- El método validado puede ser probado para estudios de estabilidad de medicamentos específicamente antitusivos siempre y cuando se use un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) ya que presenta ventajas sobre los demás instrumentos .

CAPITULO IV. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Mcnaair, Harold y Esquiél, Benjamin. Cromatografía Líquida de Alta Presión, 4ta ed. serie Química. Organización de los Estados Americanos. Washington. 1973. P. 3-6, 216P .
- 2.-Introducción to Modern Liquid Chromatography; L.Snyder y J. Kirkland, 2da. ed., Ed. J. Wiley (1979). P. 25-33, 135P
- 3.- Bidlingmeyer, Brian A. Practical HPLC Metodology and Aplications. Wiley-Interscience. BRISTOW, P.A. Liquid Chromatography in Practice. Hetp. England, 1era ed. 1976. P. 45-46, 68-75, 185P .
- 4.- Ahuja, Satinder. Selectivy and Detectability Optimization in HPLC. Vol. in Chemical Analysis Series. Wiley Interscience. U.S.A, 1989. P. 12 -15.
- 5.- Katz, Elena. Quantitative Analysis using Chromatographic Techniques. Separation Science Series. John Wiley & Sons. USA, edición 1 . 1987. P. 103 - 105.
- 6.- Scott, Raymond P.W. Techniques and Practice of Cromatography. Vol. 70. Cromatographic Science Series. Marcel Dekker. USA, 3era ed. 1995. P. 78-86, 102-106. 305P.

- 7.- Skoog, Douglas y Leary, James. Análisis Instrumental . 4ª Edición. McGraw-Hill. España. 1994. P. 18 - 21, 110P.
- 8.- Snyder, Lloyd R. And Kirkland, Joseph J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley-Interscience. USA. 1974. P. 50-62, 73-79.
- 9.- Wessely, Karl and Zech, Karl. High Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analyses. Hewlett Packard. Böblingen, 1era. ed. 1979. P. 40-45, 55-59, 150P.
- 10.- Aguilar G, Alcantara A, García II, Garzón A, Guerrero ME, et al. Validación de métodos analíticos comité de elaboración de guías oficiales de validación de la dirección general de control de insumos para la salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos Biológicos. Mexico, 1992.
- 11.- Rampazzo, paolo. Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry 1990 . P. 87 - 89.
12. - Fontani , F. Et al. Criteri di convalida dei metodi d' analisi. Boll chim farm. Vol. 126, num. 2, feb. 1987, P. 66-74.

- 13.-** Miller J.R Miller J.N, estadísticas para química analítica . segunda edición.
Impreso en USA editoria Edison - Wesley Iberoamericano S.A, 1993, P.
3-7, 11-14, 20-22, 25-30, 32-87, 98, 190P.
- 14.-** Mier P.C., Züud Richard E. Statical Methods in USA John Miley & Sons, INC.
1993. P. 15, 27 - 31, 40 - 41, 81 - 82, 84- 90, 107, 116 - 120 .
- 15.-** Brown S.D., Bear R.S. Blank T.B .Chemometric. Analchem 1992, P. 22,
62.
- 16.** Cavanaghi, luigi et al. Statistical evaluation of the results obtained with the
analytical methods used for the quanlity control of medicines . drug dev. & ind.
phaRma, 1987. P. 2571-2615, 2800P.

ACRONICOS

CLAR : Cromatografía líquida de alta resolución.

HAPLC: Cromatografía líquida de alta presión.

USP : Farmacopea de EEUU.

HCL: Acido Clorhidrico.

HBr: Bromhidrato.

CG: Cromatografía de gases.

GLOSARIO

Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo: El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Precisión: Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones

diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo o diferentes laboratorios, utilizando el mismo o diferentes equipos, etc.).

Limite de Detección: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Limite de Cuantificación: Es la menor concentración de una sustancia de una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad: Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia: La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elusión, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

Estabilidad de la Muestra: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

- b = Ordenada al origen o intercepto.
- r = Coeficiente de correlación.
- r^2 = Coeficiente de Determinación.
- CV = Coeficiente de Variación.
- IC = Intervalo de Confianza al 95%.
- Σ = Sumatoria.
- m = Pendiente.
- n = Número de replicaciones.
- t = Numero de diluciones o numero de cantidades adicionales.
- \bar{y} = Media Aritmética.
- N = Número total de determinaciones.
- S^2 = Varianza.
- DE = Desviación estándar.
- x = Dilución o cantidad adicionada.
- y = Propiedad medida o cantidad recuperada.
- R = Por ciento recuperado.
- \bar{R} = Promedio aritmético del por ciento recuperado.
- \pm = Valor de la distribución
- t^* = Valor de la distribución t de Dunnett con una probabilidad acumulada de 0.975.
- S^2_p = Varianza ponderada.

LSIC = Límite inferior del intervalo de confianza al 95%.

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza al 95%

F = Valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada 0.975.

Dep = Desviación estándar ponderada.

gL = Grados de libertad.

y ... = y total

ANEXOS

400

400

400

400

400

3.195

Area Percent Report

```

File Name      : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
Operator       :
Instrument      : ANALYZER1
Sample Name    : NOSCAPINA HCL
Time Bar Code  :
Acquired on   : 06 Nov 01 10:37 AM
Report Created on: 06 Nov 01 10:43 AM
Sample Info    : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
                  A
                  PH = 3.3 CON ACIDO FOSFORICO 89%
  
```

2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.195	8376	1373	BB	0.093	100.0000

Total area = 8376

0001

0004

2004

4004

0004

3.203

Area Percent Report

File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 10:57 AM
 Report Created on: 06 Nov 01 11:03 AM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.203	16891	2768	BB	0.094	100.0000

1 area = 16891

3.204

3.204

3.204

3.204

3.204

3.204

Area Percent Report

File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Time Bar Code:
 Sample Acquired on : 06 Nov 01 11:11 AM
 Report Created on: 06 Nov 01 11:17 AM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.204	25438	4146	BB	0.094	100.0000

1 area = 25438

Page 1

004
004
004
004
004



=====
 Area Percent Report
 =====

File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Time Bar Code:
 Printed on : 06 Nov 01 11:45 AM
 Report Created on: 06 Nov 01 11:51 AM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILLO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

k#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.210	33768	5490	BB	0.094	100.0000

area = 33768

=====
 =====

3.198

3.198

3.198

3.198

3.198

3.198

=====
 Area Percent Report
 =====

File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Time Bar Code:
 Started on : 06 Nov 01 10:45 AM
 Report Created on: 06 Nov 01 10:51 AM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH - 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.198	41888	6851	BB	0.094	100.0000

Total area = 41888

=====

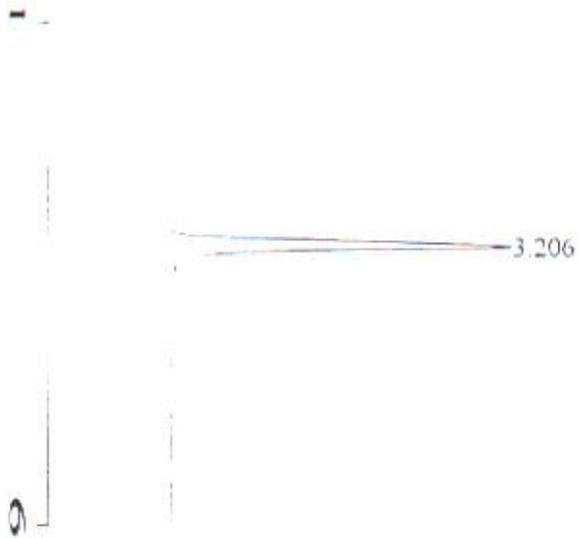
1004

1004

1004

1004

1004



 Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 11:31 AM
 Report Created on: 06 Nov 01 11:37 AM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.206	16856	2751	BB	0.094	100.0000

Total area = 16856

200

400

600

800

1000

3.203

=====
 Area Percent Report
 =====

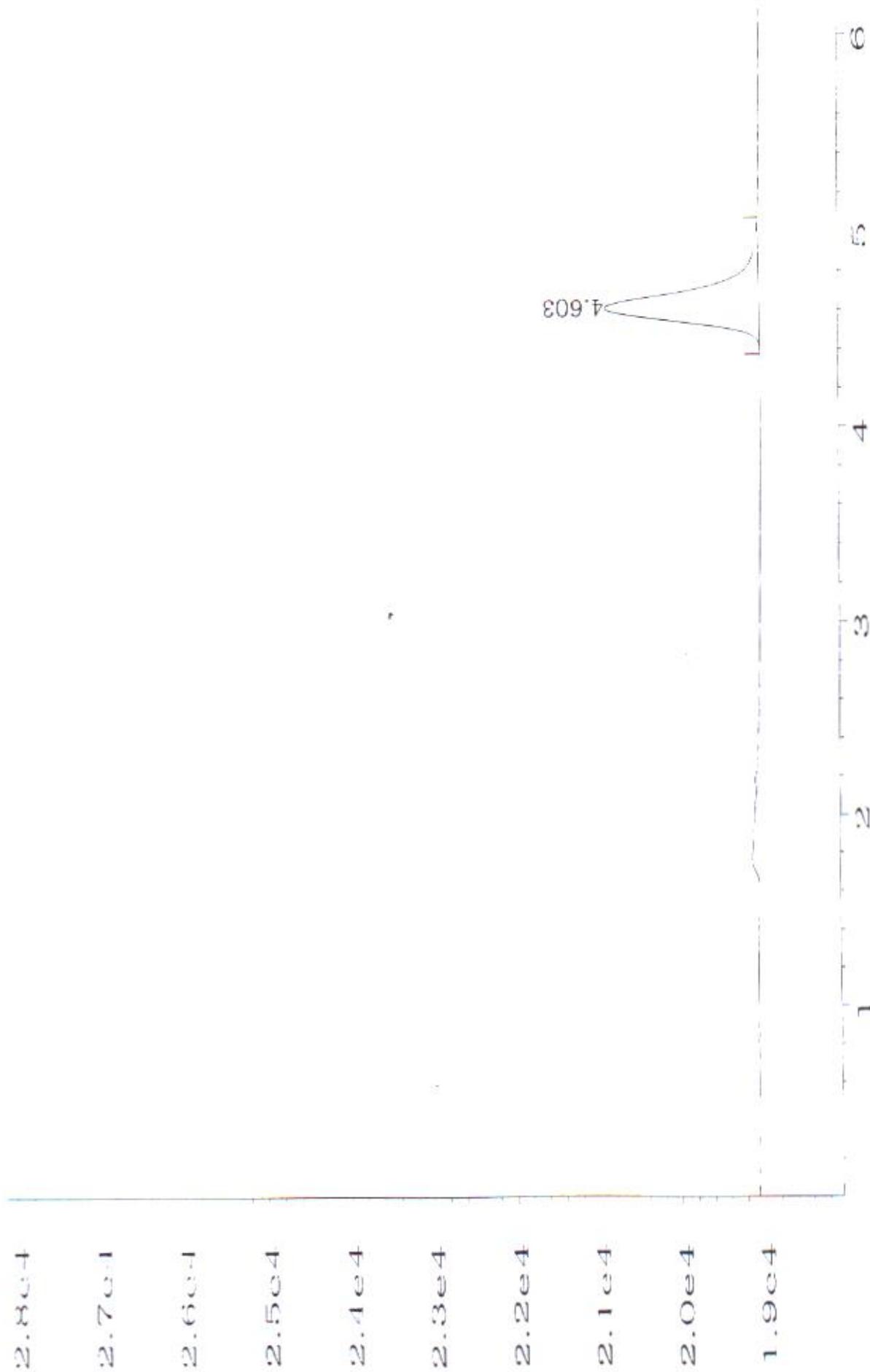
Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Sample Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 11:18 AM
 Report Created on: 06 Nov 01 11:24 AM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.203	25493	4155	BB	0.094	100.0000

Total area = 25493



804

004

204

404

604

3.211

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Sample Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 11:52 AM
 Report Created on: 06 Nov 01 11:58 AM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILLO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.211	33814	5506	BB	0.094	100.0000

Total area = 33814

100 400 200 400 600

3.210

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
Operator :
Instrument : ANALYZER1
Sample Name : NOSCAPINA HCL
Run Time Bar Code:
Acquired on : 06 Nov 01 11:59 AM
Report Created on: 06 Nov 01 12:05 PM
Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
A
PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
Vial Number :
Injection Number :
Sequence Line :
Instrument Method: NOSCA.MTH
Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.210	41818	6807	BB	0.094	100.0000

Total area = 41818

**PRECISION DEL SISTEMA DE : TOSEBA (NOSCAPINA
CLORHIDRATO)**

304

004

204

404

604



 Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAFINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 12:45 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 12:51 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.218	33827	5488	BB	0.095	100.0000

Total area = 33827

1004

1004

2004

4004

6004

3.219

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 12:37 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 12:43 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.219	33822	5493	BB	0.094	100.0000

Total area = 33822

004

004

004

004

004

3.219

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 12:31 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 12:37 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret. Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.219	33886	5494	BB	0.095	100.0000

Total area = 33886

1004

1004

1004

1004

1004

3.217

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 12:24 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 12:30 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.217	33831	5496	BB	0.094	100.0000

Total area = 33831

804

004

204

404

604

3.215

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 12:17 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 12:23 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.215	34023	5508	BB	0.095	100.0000

Total area = 34023

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE: DEXTROMETORFANO

X
C
C
C
C



Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D
Operator :
Instrument : ANALYZER1
Sample Name : DEXTROMETORFANO
Run Time Bar Code :
Acquired on : 09 Nov 01 03:58 PM
Report Created on: 09 Nov 01 04:04 PM
Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TRIETILAMINA LLEVAR A
PH = 3.50 CON ACTDO FOSFORICO

Page Number : 1
Vial Number :
Injection Number :
Sequence Line :
Instrument Method: DEXTROM.MTH
Analysis Method : DEXTROM.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	4.512	15178	1491	BB	0.154	100.0000

Total area = 15178

1

2

3

4

5

4.331

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : DEXTROMETORFANO
 Sample Time Bar Code:
 Acquired on : 09 Nov 01 04:11 PM
 Report Created on: 09 Nov 01 04:16 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILLO:AGUA:TRIETILAMINA LLEVAR A
 PH = 3.50 CON ACTDO FOSFORICO

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: DEXTROM.MTH
 Analysis Method : DEXTROM.MTH

g. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	4.331	20237	1979	BB	0.155	100.0000

Total area = 20237

1 1 1 1 1



Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D
Operator :
Instrument : ANALYZER1
Sample Name : DEXTROMETORFANO
Run Time Bar Code :
Acquired on : 09 Nov 01 04:17 PM
Report Created on: 09 Nov 01 04:23 PM
Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TRIETILAMINA LLEVAR A
PH = 3.50 CON ACIDO FOSFORICO

Page Number : 1
Vial Number :
Injection Number :
Sequence Line :
Instrument Method: DEXTROM.MTH
Analysis Method : DEXTROM.MTH

g. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	4.530	25279	2467	BB	0.155	100.0000

Total area = 25279

**PRECISION DEL SISTEMA DE : DEXTROMETROFANO
BROMHIDRATO**

X
100
100
100
100



=====
Area Percent Report
=====

Sample File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D
Operator :
Instrument : ANALYZER1
Sample Name : DEXTROMETORFANO
Run Time Bar Code:
Acquired on : 09 Nov 01 04:39 PM
Report Created on: 09 Nov 01 04:44 PM
Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TRIEFILAMINA LLEVAR 2
PH = 3.50 CON ACTDO FOSFORICO

Page Number : 1
Vial Number :
Injection Number :
Sequence Line :
Instrument Method: DEXTROMO.MTH
Analysis Method : DEXTROMO.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\DEXTRO.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	4.540	20233	1971	BB	0.156	100.0000

Total area = 20233

=====

File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NV-R0107.D
 Sample :
 Experiment : ANALYSEP1
 Sample Name :
 Run Time Bar Code :
 Acquired on : 12 Nov 01 11:26 AM
 Report Created on : 12 Nov 01 11:26 AM

Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: KETO.MTH
 Analysis Method : KETO.MTH

File Name C:\HPCHEM\1\DATA\NV-R0107.D

Peak	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	4.608	20216	1892	BB	0.162	100.0000

Total area = 20216



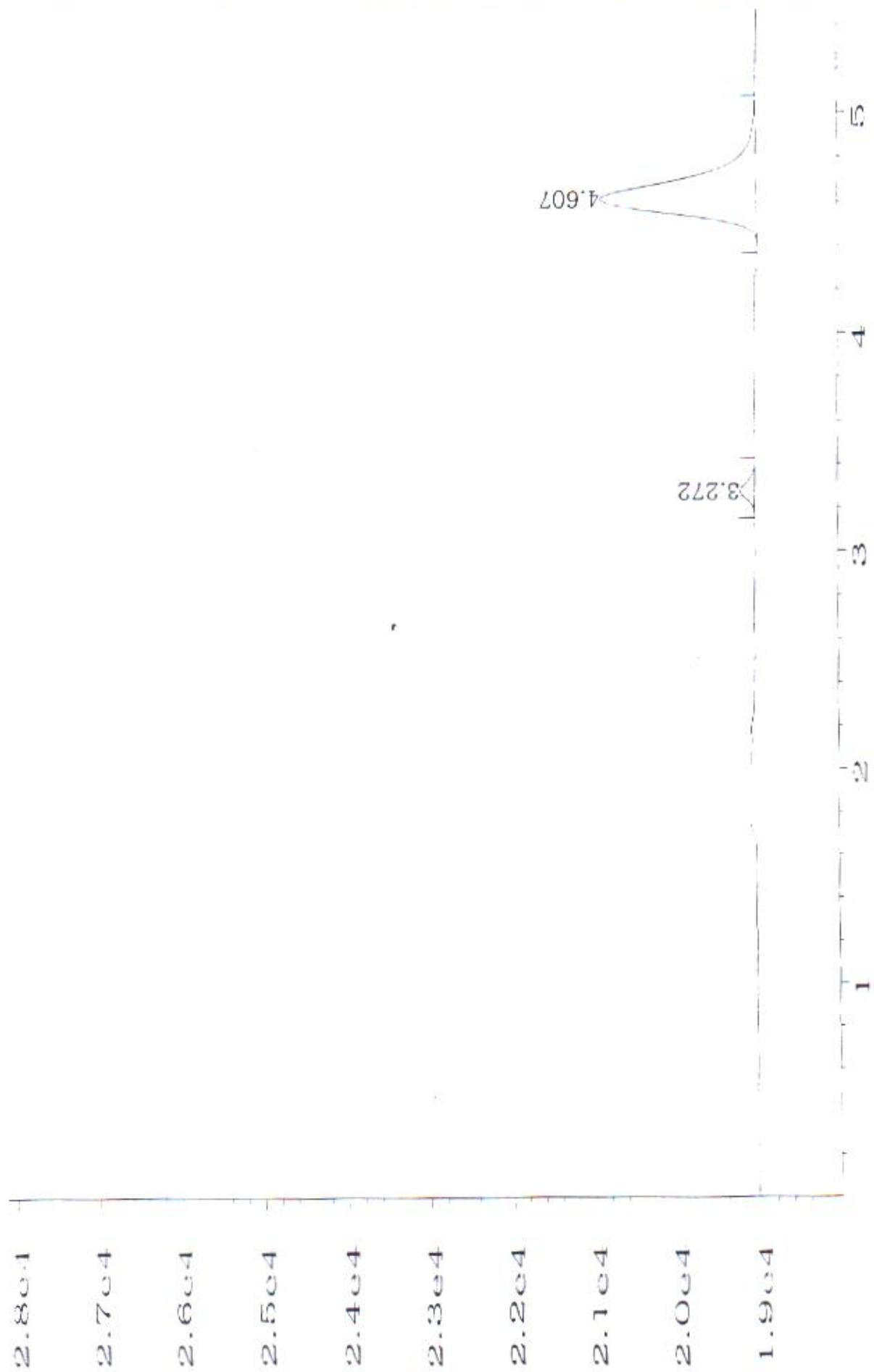


=====
File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NV-R0106.D Page Number : 1
Operator : Vial Number :
Instrument : ANALYZER1 Injection Number :
Sample Name : Sequence Line :
In Time Bar Code : Instrument Method: KETO.MTH
Acquired on : 12 Nov 01 11:14 AM Analysis Method : KETO.MTH
Report Created on: 12 Nov 01 11:20 AM

1. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NV-R0106.D

Peak	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	3.272	957	174	BB	0.086	4.4959
2	4.607	20329	1900	BB	0.162	95.5041

Total area = 21286



Area Percent Report

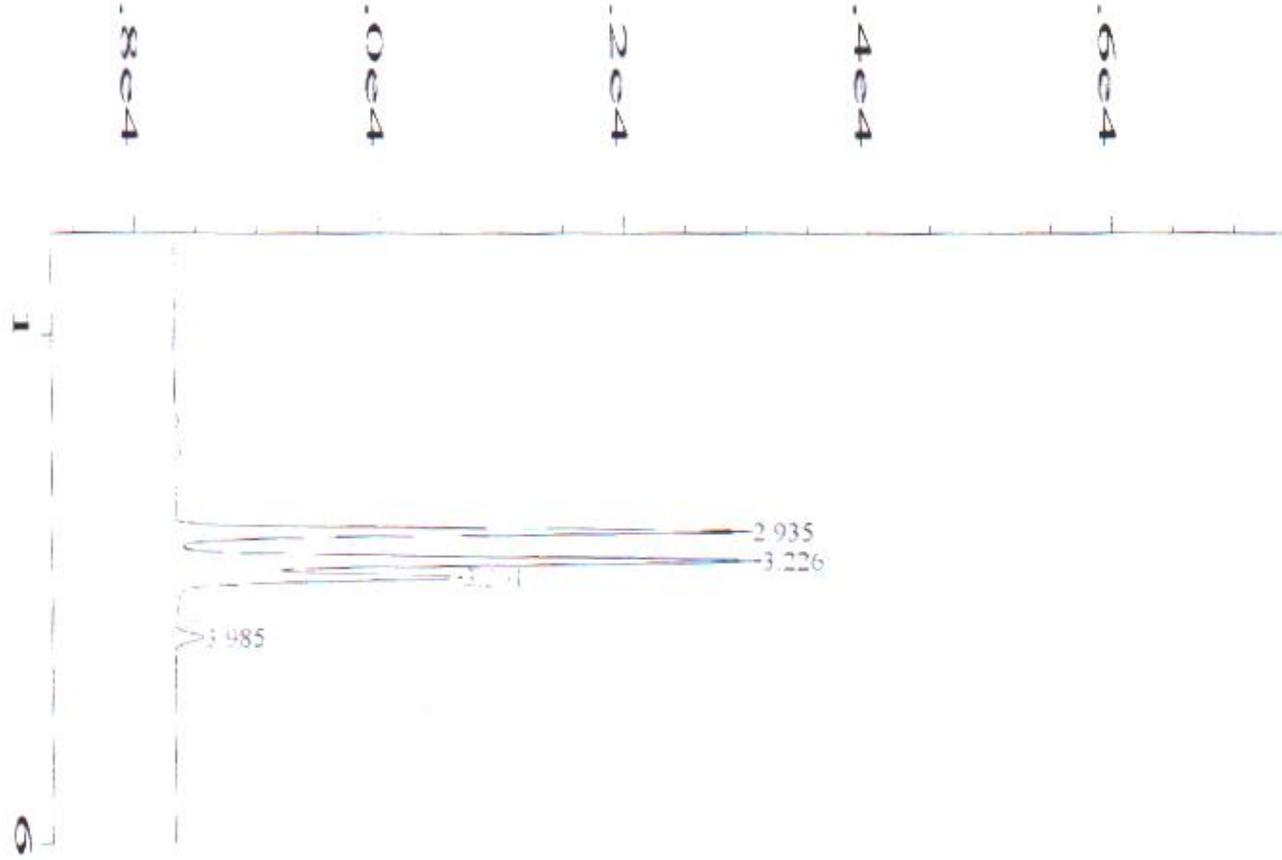
File Name : C:\HSCHEM\1\DATA\NV-R0104.D
Report :
Comment : ANALYZER1
Sample Name :
Sample Bar Code:
Printed on : 12 Nov 01 10:59 AM
Report Created on: 12 Nov 01 11:05 AM

Page Number : 1
Vial Number :
Injection Number :
Sequence Line :
Instrument Method: KETO.MTH
Analysis Method : KETO.MTH

1. 2 in C:\HSCHEM\1\DATA\NV-R0104.D

Peak	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	4.603	20258	1899	BB	0.162	100.0000

Total area = 20258



=====
 Area Percent Report
 =====

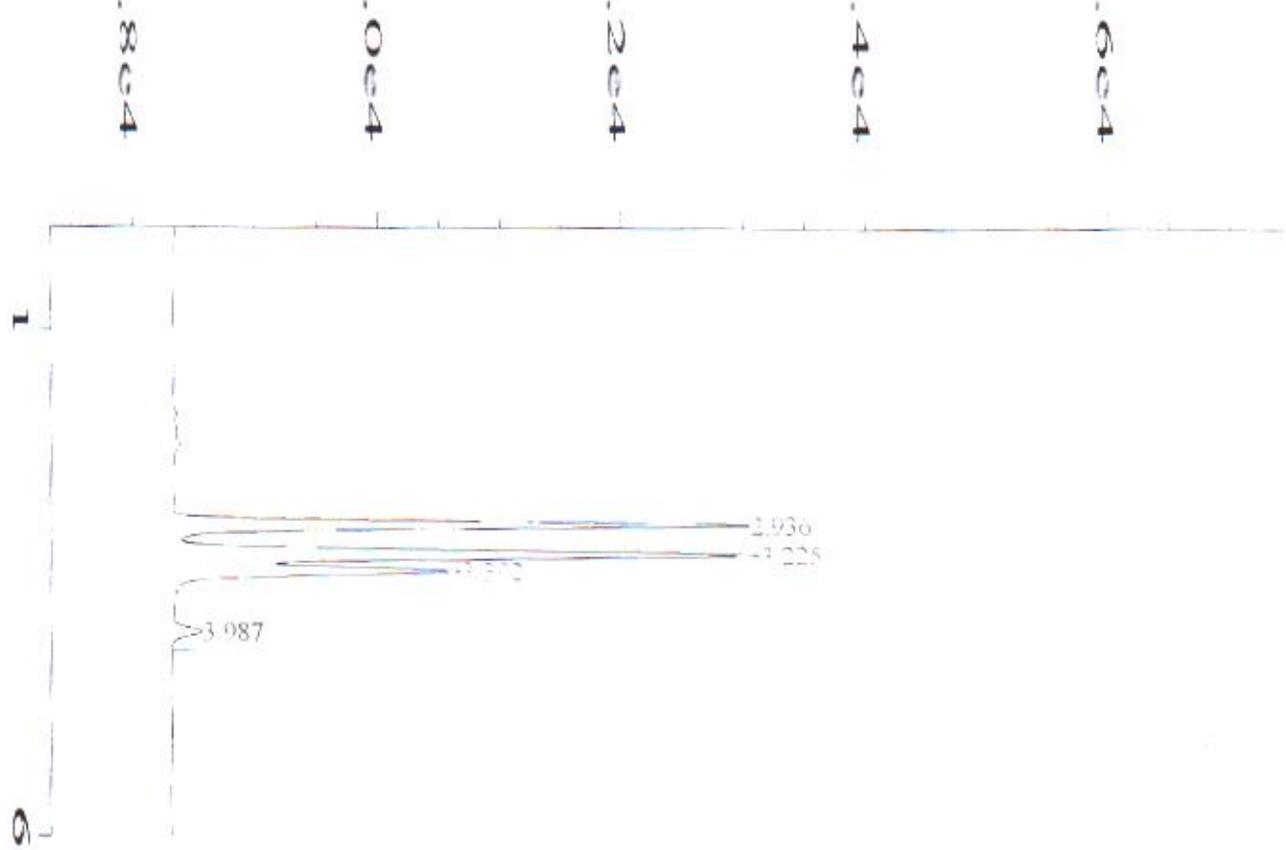
Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 01:58 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 02:04 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	2.935	23664	4705	BV	0.078	35.1185
2	3.226	28982	4777	VV	0.094	43.0094
3	3.391	13401	2324	VB	0.087	19.8880
4	3.985	1337	227	BB	0.092	1.9841

Total area = 67384

=====



=====
 Area Percent Report
 =====

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 01:51 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 01:57 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILLO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

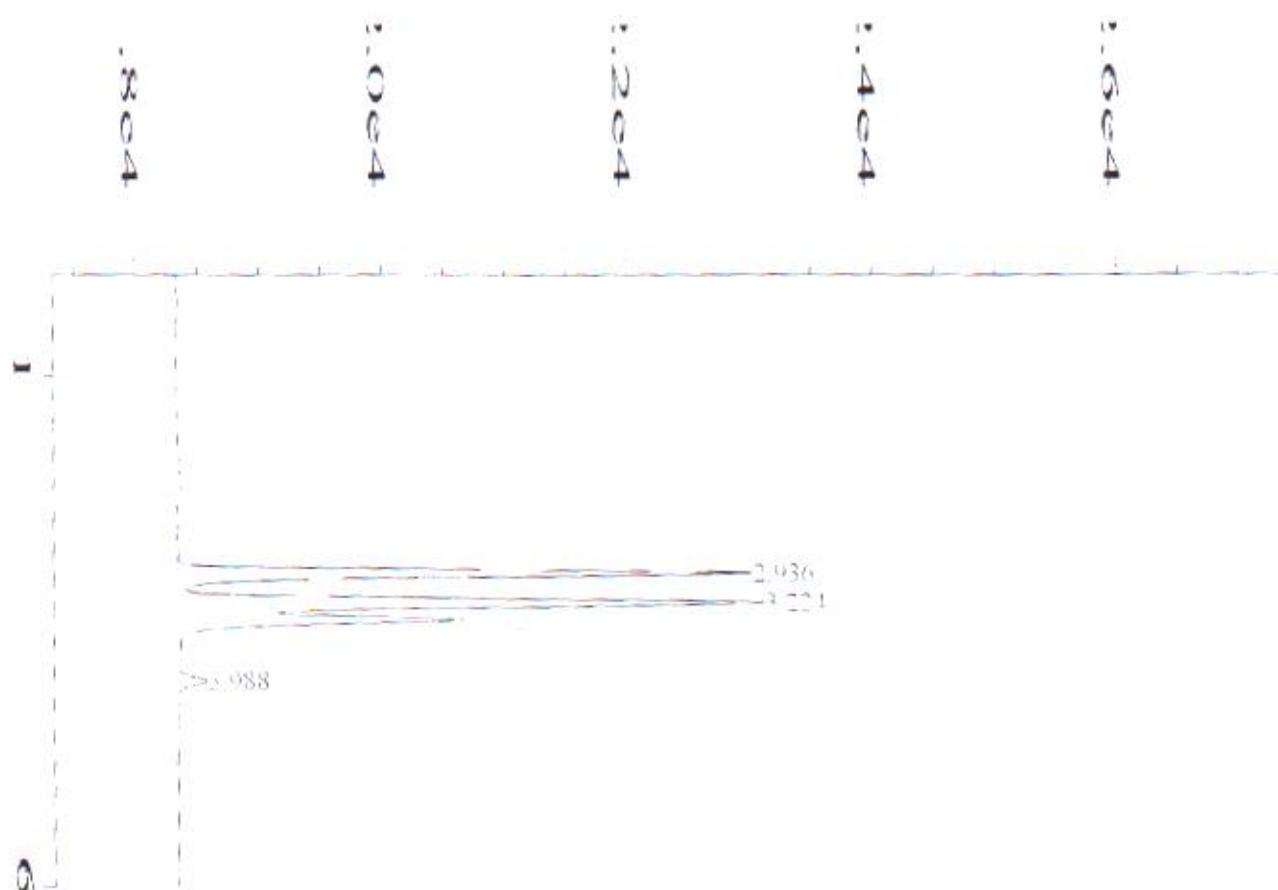
Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	2.936	23626	4707	BV	0.077	35.0824
2	3.225	28994	4785	VV	0.093	43.0526
3	3.392	13369	2323	VB	0.087	19.8518
4	3.987	1356	233	BB	0.090	2.0131

Total area = 67345

=====



=====
 Area Percent Report
 =====

File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Time Bar Code:
 Started on : 06 Nov 01 01:44 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 01:50 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILLO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

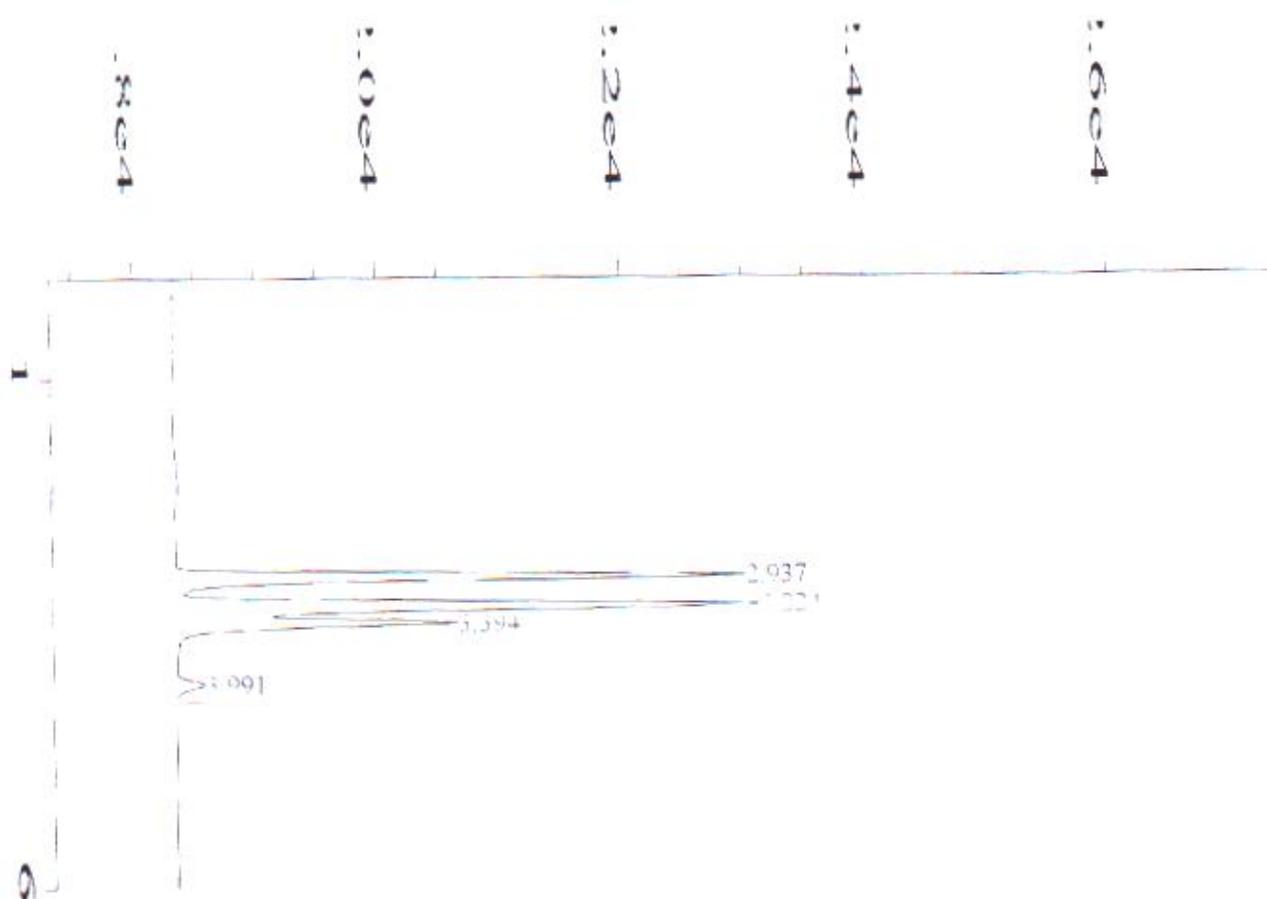
Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NOSCA.MTH
 Analysis Method : NOSCA.MTH

2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	2.936	23434	4669	BV	0.077	35.0521
2	3.224	28841	4761	VV	0.093	43.1410
3	3.392	13239	2302	VB	0.087	19.8033
4	3.988	1340	227	BB	0.092	2.0037

Total area = 66854

=====



=====
 Area Percent Report
 =====

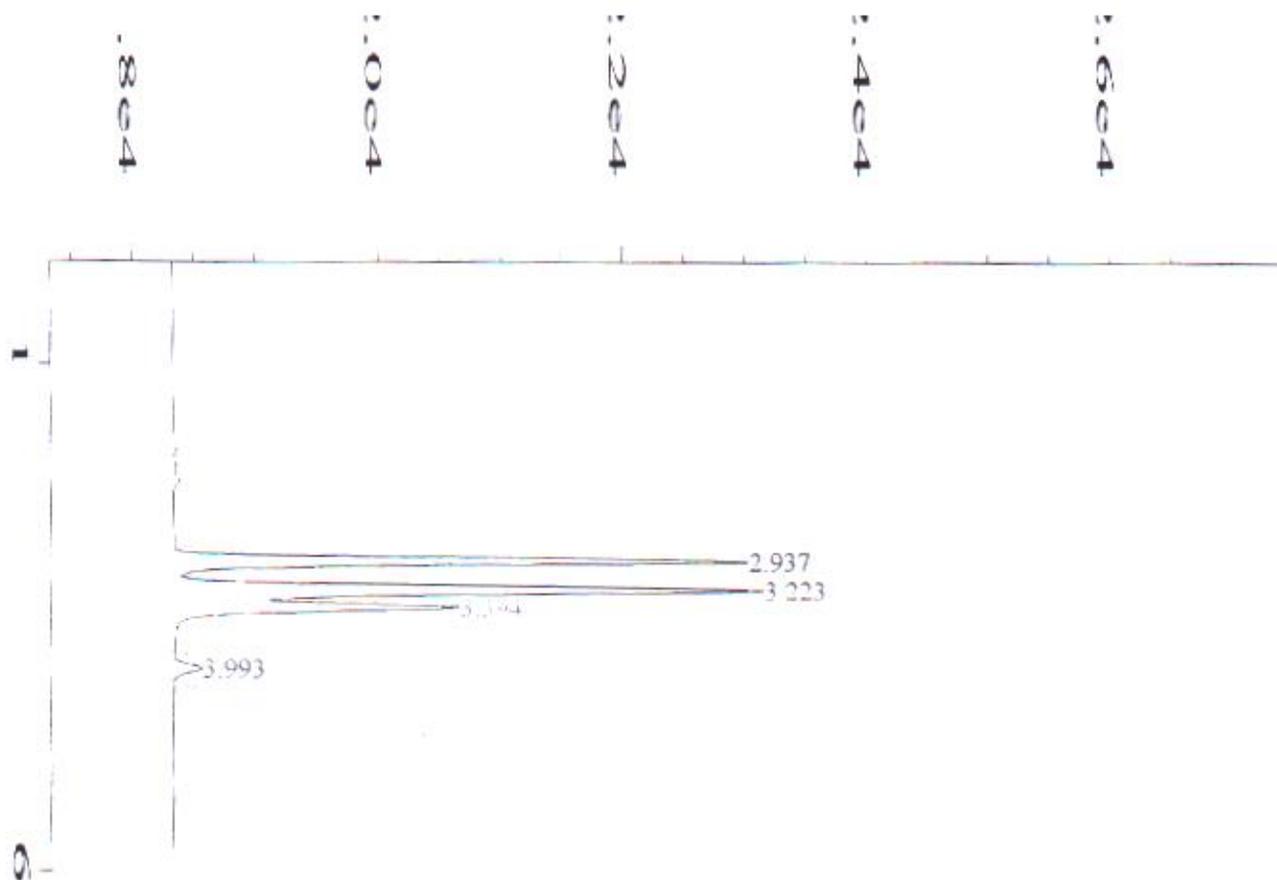
Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 01:37 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 01:43 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILLO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	2.937	23472	4666	BV	0.077	35.0072
2	3.224	29010	4776	VV	0.094	43.2665
3	3.394	13233	2299	VB	0.087	19.7357
4	3.991	1335	226	BB	0.092	1.9906

Total area = 67050

=====



=====
 Area Percent Report
 =====

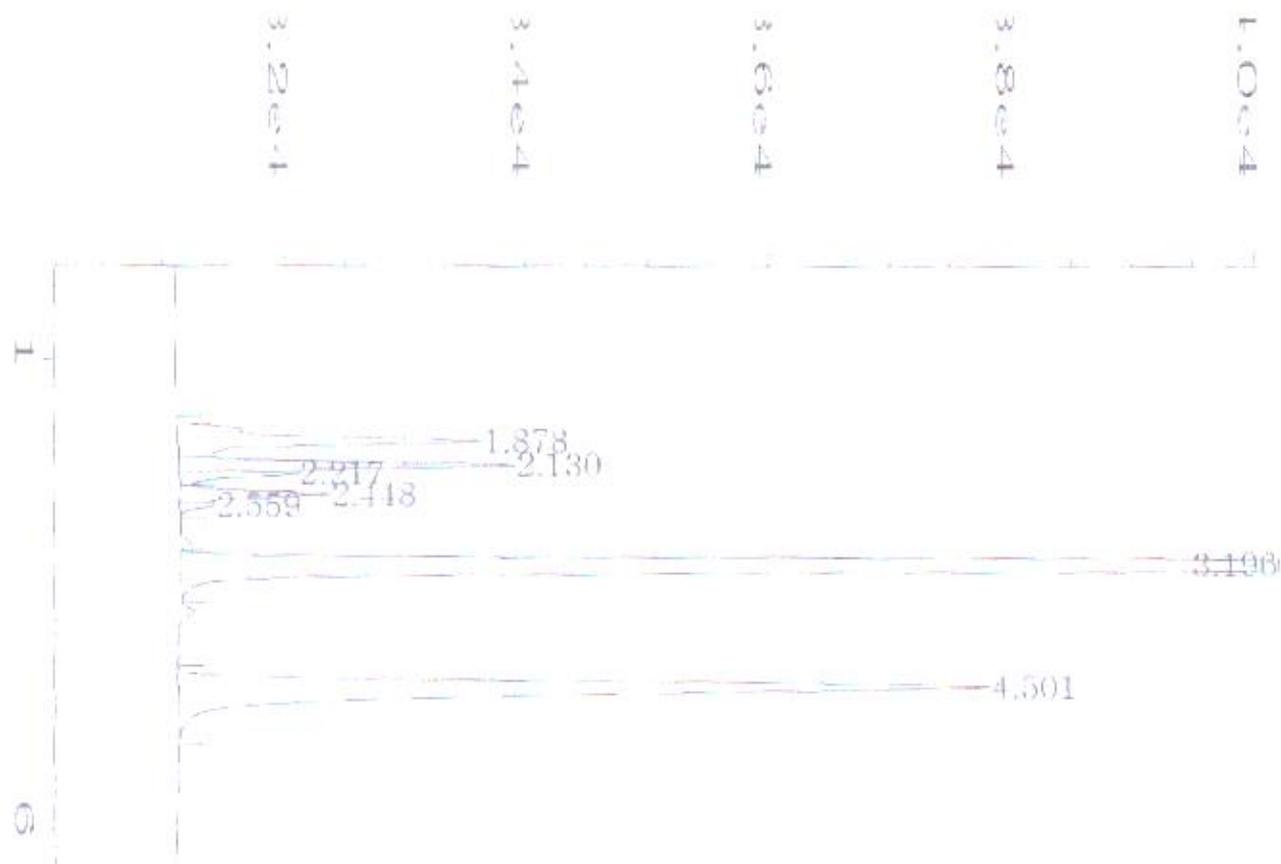
Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name : NOSCAPINA HCL
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 06 Nov 01 01:31 PM
 Report Created on: 06 Nov 01 01:37 PM
 Sample Info : FASE MOVIL 500:500:4 ACETONITRILO:AGUA:TTRIETILAMINA LLEVAR
 A
 PH = 3.5 CON ACIDO FOSFORICO 89%

Fig. 2 in C:\HPCHEM\1\DATA\NOSCA.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	2.937	23489	4683	BV	0.077	34.9398
2	3.223	29108	4801	VV	0.093	43.2980
3	3.394	13293	2308	VB	0.087	19.7730
4	3.993	1337	226	BB	0.092	1.9891

Total area = 67226

=====



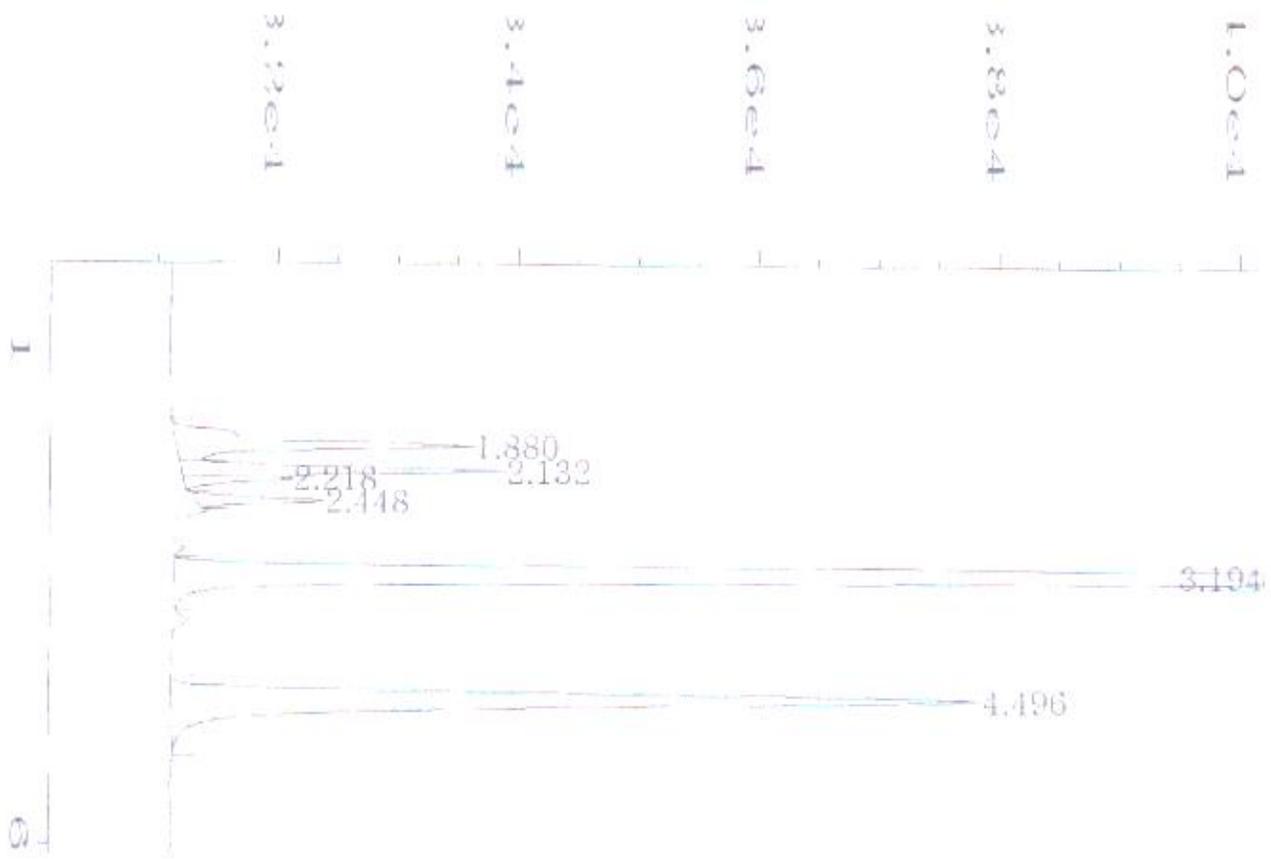
Area Percent Report

File Name : C:\AHECHEM\1\DATA\NV-R0146.D
 Operator :
 Instrument : ANALYZER1
 Sample Name :
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 13 Nov 01 04:16 PM
 Report Created on: 13 Nov 01 04:25 PM
 Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: NETO.MTH
 Analysis Method : FETC.MTH

g. 2 LE C:\AHECHEM\1\DATA\NV-R0146.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	1.878	18247	2520	BV	0.104	4.6981
2	2.130	13676	2774	VV	0.075	3.5151
3	2.217	4518	991	VV	0.057	1.1607
4	2.448	6445	1247	VV	0.079	1.6846
5	2.559	1322	293	VB	0.058	0.3345
6	3.196	277765	49400	PV	0.087	71.3647
7	4.501	60977	6714	BB	0.142	15.1240

Total area = 389270



Area Percent Report

Data File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\NV-R0145.D
 Operator :
 Instrument : ANALYSER1
 Sample Name :
 Run Time Bar Code:
 Acquired on : 13 Nov 01 04:12 PM
 Report Created on: 13 Nov 01 04:18 PM
 Page Number : 1
 Vial Number :
 Injection Number :
 Sequence Line :
 Instrument Method: REFC.MTH
 Analysis Method : REFC.MTH

Fig. 2 In C:\MSDCHEM\1\DATA\NV-R0145.D

PK#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	1.880	17432	2472	BV	0.131	4.5863
2	2.132	13174	2693	VV	0.074	3.4383
3	2.218	3713	307	VV	0.041	0.9693
4	2.448	4671	1087	PV	3.029	1.2190
5	3.194	277219	43254	PV	0.087	72.3505
6	4.496	22362	6740	SB	0.144	17.4967

Total area 363161

CERTIFICATE OF ANALYSIS

LiChroCART® 250-4 HPLC-Cartridge

LiChrospher® 100 RP-8 (5µm)

79925MO-584

Cartridge No. 616818

Sorbent Lot No. L239616

1. PACKING MATERIAL

This batch of packing material has successfully passed all production quality tests regarding our specifications for reproducibility

- a. retention factor k
- b. separation factors
- c. efficiency N
- d. chemical stability
- e. packing stability

2. COLUMN TEST

This column has passed all production quality tests with respect to:

- a. plate number N
- b. asymmetry factor A_s

Toluene

$$k = 1.3$$

$$A_s = 1.0$$

$$N/m = 86110$$

$$\Delta p = 69 \text{ bar}$$

Specification

$$A_s = 0.8-1.4$$

$$N_{\min}/m = 50000$$

Sample Components

- 1. Toluene
- 2. Naphthalene
- 3. Anthracene

COLUMN PERFORMANCE TEST CHROMATOGRAM

