

República Bolivariana de Venezuela
Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Química



Trabajo Especial de Grado

*DESARROLLO DE UN METODO PARA LA DETERMINACION DE
ACETAMINOFEN, FENILEFRINA Y SUS PRODUCTOS DE
DEGRADACION EN FORMULACIONES FARMACEUTICAS PARA
EL RESFRIADO COMUN*

Presentado por:

Br. Erick G. Báez B.

Tutores:

Dr. Luis Gómez

Caracas, Octubre de 2010

Agradecimientos

En primer lugar, este trabajo de investigación está dedicado a toda mi familia, en especial padre, madre, tía Yesenia, tía Yudith, hermano y hermanita. Gracias al apoyo incondicional de estas personas a lo largo de estos cinco años, los cuales han sido de gran aprendizaje y crecimiento personal, hoy en día cuento con todos los requisitos para optar al título de Licenciado en Química. Un agradecimiento especial le doy a mi novia, quien ha sido un pilar de apoyo y fuente de inspiración en este último año.

A su vez, quiero aprovechar la oportunidad para reconocer la gran formación académica y humana que me ha dado la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Destacando en mi formación, la influencia de profesores como Nancy Prieto, Julio Osuna, Carlos China, Gustavo Cabrera y el viejito Luis Gómez. También, Dheivy Acevedo, Jaxeira Padrino y Fátima Abreu, quienes han sido una fuente inagotable de energía y apoyo en los momentos que más lo he necesitado.

Finalmente, quiero agradecer todo el apoyo brindado por el Licenciado Jorge Colmenares, quién es fuente de inspiración profesional e intelectual para mi persona. En particular, es el prototipo de profesional que quisiera algún día llegar a ser. También, agradezco la oportunidad brindada por la compañía Procter and Gamble, especialmente a todo el grupo de analítica y microbiología quienes han sido catalizadores en mi crecimiento profesional. Además, un grupo de trabajo maravilloso.

Resumen

En este trabajo de investigación, se desarrolló un método de cromatografía líquida en fase reversa para la separación simultánea de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina y los posibles productos de degradación del acetaminofén (Dimeros) y la fenilefrina (o-pc, ciclación en la posición “orto” del anillo fenólico) y (p-pc, ciclación en la posición “para” del anillo fenólico), mediante el uso de un software especializado (OptichromLC) en el modelado de la cromatografía líquida en fase reversa a través de la construcción y evaluación de los perfiles de retención ($\log k$ Vs %B) de los analitos de interés.

La instrumentación empleada para la separación cromatográfica de estos siete (7) compuestos fue una columna Waters Xbridge de 150 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y 3,5 μm de tamaño de partícula. Además, se utilizó un flujo de fase de móvil de 1 mL min⁻¹ con un gradiente de solvente constituido por metanol/solución de tetraborato de sodio (10 mM) a pH 9,38.

Adicionalmente, se evaluó figuras de mérito como la especificidad, linealidad, intervalo lineal de respuesta, límite de cuantificación, límite de detección, exactitud y precisión del método cromatográfico.

Finalmente, se aplicó el método cromatográfico para el monitoreo de los analitos de interés en un producto farmacéutico comercial. Encontrando que el método cromatográfico desarrollado y optimizado con el uso de OptichromLC, es adecuado para el análisis simultáneo de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina y los productos de degradación propuestos en este trabajo (dimeros del acetaminofén, o-pc y p-pc).

Indice

INTRODUCCION	1
Acetaminofen	2
Historia del Acetaminofén	3
Farmacocinética del Acetaminofén	4
Problemas relacionados con la sobreexposición al Acetaminofén	5
Fenilefrina	6
Farmacocinética de la Fenilefrina	7
Contraindicaciones de la ingesta de Fenilefrina	7
Clorfeniramina	8
Productos de degradación	9
REVISION BIBLIOGRAFICA	13
Técnicas de uso común en la separación de activos en la industria farmacéutica	13
Cromatografía Líquida en Fase Reversa ó RPLC	13
Componentes del equipo de RPLC	13
Técnicas de Detección	16
Espectroscopia de Absorción Molecular UV-Visible	16
Antecedentes	17
Justificación	24
OBJETIVOS	25
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	26
Instrumentación	27
Reactivos	28
Búsqueda de las Condiciones Cromatográficas	29
Preparación de Patrones de Referencia	29
Hidroclorato de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina	29
Preparación de los Productos de Degradación	29
Productos de Degradación del Acetaminofén	29
Productos de Degradación de la Fenilefrina	29
Preparación de la Muestra Sintética	29
Modelado y Optimización del Método Analítico mediante OptichromLC	30
Uso del Software (OptichromLC)	30
Medición de Figuras de Mérito	33
Concentración de los Productos de Degradación	34
Productos de Degradación del Acetaminofén (Dimeros)	34
Productos de Degradación de la Fenilefrina (o-pc, p-pc)	34
Figuras de Mérito	34
Especificidad	35
Linealidad	35
Límite de Cuantificación (LOQ)	37
Límite de Detección	37
Precisión	37
Exactitud	38
Muestra	38
Preparación de la Muestra	38

RESULTADOS EXPERIMENTALES	40
Selección del Modificador Orgánico	40
Metanol/Solución Amortiguadora de Amoniaco-Formiato de Amonio 10mM	40
Acetonitrilo/Solución Amortiguadora de Amoniaco-Formiato de Amonio 10mM	47
Metanol/Solución de Tetraborato de Sodio (10mM) a pH 9,38	52
Figuras de Mérito	57
Aplicación del Método Cromatográfico en una muestra farmacéutica comercial	65
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	69
APENDICE	70
BIBLIOGRAFIA	77

1. Introducción

El hombre ha sufrido de ciertas enfermedades patológicas a través del tiempo, muchas de estas enfermedades pueden conducir a la muerte pero también pueden ser tratadas e incluso erradicadas con el uso de medicamentos naturales y sintéticos. Por esta razón, la aparición de medicamentos destinados al tratamiento de síntomas de gripe, migraña y problemas estomacales entre otros, ha sido parte fundamental en el alcance de una mejor calidad de vida. Dichos medicamentos están constituidos por compuestos químicos que cumplen una función específica en el organismo, estos se denominan “componentes activos”. No obstante, estas sustancias pueden experimentar transformaciones químicas a través de su vida útil, estos nuevos compuestos se denominan productos de degradación y con frecuencia carecen de beneficio biológico e incluso pueden ser nocivos para la salud del paciente.

Debido a que los componentes activos pueden degradarse, diferentes organismos internacionales como la Pharmacopoeia Europea y la Conferencia Internacional de Harmonización ó ICH (International Conference of Harmonization, por sus siglas en inglés) ofrecen lineamientos para el estudio de estabildades químicas y validación de métodos entre otros, con el fin de asegurar que la concentración de los componentes activos y sustancias afines no exceda un valor límite regulado en medicamentos.

Es por ello que en el presente trabajo de investigación, se plantea el uso de la Cromatografía Líquida en Fase Reversa ó RPLC (Reverse Phase Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) para desarrollar un método analítico con el fin de determinar de manera simultánea acetaminofén, fenilefrina y sus posibles productos de degradación, además de clorfeniramina, en formulaciones farmacéuticas para el resfriado común. Estos compuestos serán tratados a continuación.

1.1 Acetaminofén

El acetaminofén ó paracetamol es un fármaco que muestra propiedades analgésicas y antipiréticas, es decir, se utiliza para el tratamiento de la cefalea común, afecciones musculares y disminución de la fiebre ^[1]. Los nombres de paracetamol ó acetaminofén provienen de la nomenclatura química de este compuesto, el cual se puede nombrar químicamente de dos formas, N-**acetil**-para-**aminofenol** (acetaminofén) y **para-acetil-aminofenol** (paracetamol). En la figura 1, se presenta la estructura molecular:

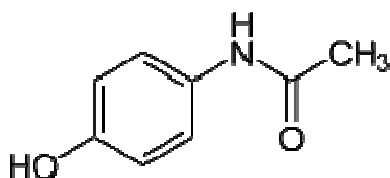


Figura 1. Estructura del Acetaminofén

Dicho fármaco se presenta comercialmente en cápsulas, comprimidos, supositorios o gotas de administración oral. El hecho de tener un amplio espectro de formas comerciales se debe a que es ingrediente frecuente de productos contra el resfriado común y la gripe. La ventaja de este fármaco es que a diferencia de los analgésicos opioides, no provoca euforia o altera el estado anímico del paciente ^[1].

Cuando se hace referencia a los analgésicos opioides, se apunta a los productos naturales derivados del opio como la morfina y codeína, o que son compuestos semisintetizados a partir de estos últimos como la heroína y oxycodona ^[1]. Los cuatro compuestos anteriormente mencionados son drogas ampliamente conocidas por su poderoso efecto analgésico. Sin embargo, también son capaces de producir adicción, a diferencia del Acetaminofén ^[1].

1.2 Historia del Acetaminofén

En la antigüedad y durante el Medioevo (siglo V – XV), los únicos agentes antipiréticos se extraían de la corteza del sauce y la quina, de esta última se extrajo la quinina, compuesto con actividad antimalárica ^[2]. Ante la escasez de la quinina en la década de 1880, y el aumento de la mortalidad como consecuencia de la alta incidencia de casos de malaria, fue necesario aislar un ingrediente activo alternativo. Dos agentes antipiréticos alternativos fueron la acetanilida en 1886 y la fenacetina en 1887 ^[2]. La figura 2 representa la estructura molecular de ambos compuestos:

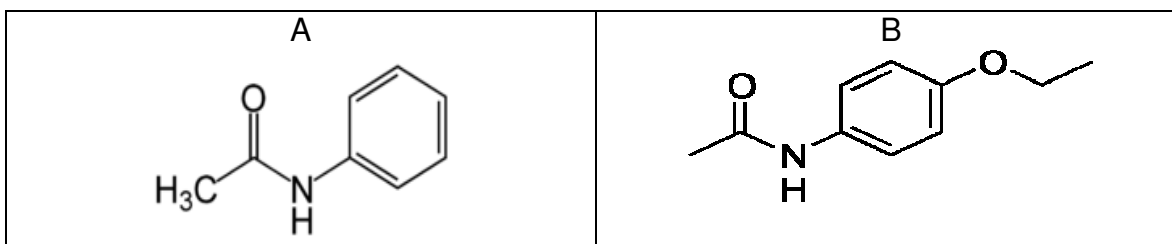


Figura 2. a) Acetanilida; b) Fenacetina

En 1946, Bernard Brodie y Julius Axelrod ^[3], se propusieron estudiar la razón por la cual compuestos como la fenacetina y la acetanilida producían deformaciones en la molécula de hemoglobina (patología conocida como metahemoglobinemia) ^[3,4], causante de la deficiencia de oxígeno en el organismo. Este estudio finalizó en 1948 y llevó a la conclusión de que la ingesta de fenacetina y acetanilida estaba relacionada con la metahemoglobinemia y dedujeron que su efecto analgésico era debido a su metabolito paracetamol ^[3,4]. Por lo tanto, propusieron el uso de paracetamol ó acetaminofén ya que no contenía los efectos tóxicos de la fenacetina y la acetanilida ^[3].

El paracetamol fue comercializado en los Estados Unidos a partir de 1955 extendiéndose por todo el mundo, suplantando a otros analgésicos con ácido

acetilsalicílico como constituyente. Este último compuesto, genera problemas gastrointestinales pero sigue siendo muy efectivo para evitar la formación de coágulos sanguíneos, por lo cual hoy en día es ampliamente usado para prevenir el infarto agudo al miocardio ^[1].

1.3 Farmacocinética del Acetaminofén

El acetaminofén se absorbe rápida y completamente por vía oral e intravenosa. Se metaboliza principalmente en el hígado donde la mayor parte se convierte en compuestos inactivos por formación de sulfatos y glucoronidos, posteriormente excretados por los riñones ^[4]. Sólo una pequeña porción se metaboliza en el hígado mediante el sistema enzimático del citocromo P-450, por acción de las oxidasas mixtas, originando la N-acetil-p-benzoquinonimina (NAPQI, por sus siglas en inglés) ^[4]. Este último compuesto es inactivado por reacción con el grupo sulfhidrilo de la glutatona y eliminado en la orina como ácido mercaptúrico ^[4].

Hasta hace pocos años se especulaba que el mecanismo de acción del paracetamol es similar al del ácido acetilsalicílico, lo que significa que actúa reduciendo la síntesis de prostaglandinas, compuestos relacionados con los procesos febriles y el dolor. La síntesis de prostaglandinas se detiene o desacelera debido a la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) ^[4], enzima que permite al organismo producir prostaglandinas. No obstante, hay diferencias importantes entre los efectos del ácido acetilsalicílico y el acetaminofén, lo que sugiere que estos compuestos actúan de forma diferente dentro del organismo ^[4], como se expone a continuación:

- 1) Las prostaglandinas participan en procesos inflamatorios, pero el acetaminofén no presenta actividad antiinflamatoria apreciable.

2) El ácido acetilsalicílico y otros antiinflamatorios no esteroides son perjudiciales para la mucosa gástrica, donde las prostaglandinas desempeñan un papel protector, pero el acetaminofén no produce daños en la mucosa gástrica.

3) Mientras el ácido acetilsalicílico actúa como un inhibidor irreversible de la COX y bloquea el centro activo de la enzima directamente, el acetaminofén la bloquea indirectamente y este bloqueo es inútil en presencia de peróxidos. Esto explica por qué el acetaminofén es eficaz en el sistema nervioso central y en células endoteliales pero no en plaquetas y células del sistema inmunológico, las cuales poseen niveles altos de peróxido.

En realidad no se conoce exactamente como opera el acetaminofén dentro del organismo pero se sabe que es dañino a concentraciones relativamente altas ^[1,4]. Este será el tema de estudio en la siguiente subsección.

1.4 Problemas relacionados con la sobreexposición al Acetaminofén

El hígado es un órgano presente en los vertebrados, además de ser la glándula más voluminosa también es uno de los órganos más importantes. Dentro del hígado se sintetizan proteínas plasmáticas. El mismo cumple funciones desintoxicantes, almacena vitaminas, glucógeno y además elimina de la sangre las sustancias que pueden ser nocivas para el organismo, transformándolas en sustancias inocuas ^[4]. El acetaminofén es un compuesto que afecta este órgano.

El mecanismo de defensa del hígado se basa en reacciones químicas mediante liberación de ácido glucorónico y compuestos azufrados para convertir el exceso de acetaminofén en productos que son fácilmente desechados en la orina ^[4]. El remanente de acetaminofén es oxidado a NAPQI por el sistema enzimático del citocromo P-450 ^[4], como se muestra en la figura 3:

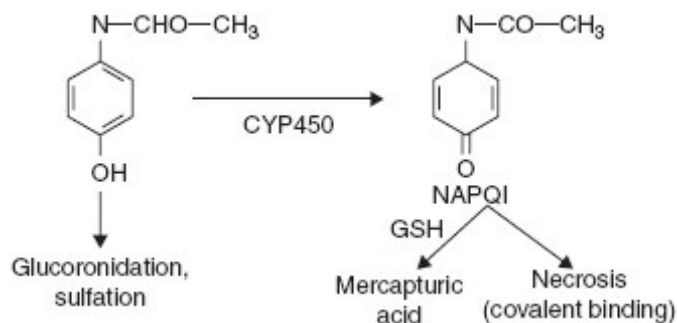


Figura 3. Producción de NAPQI por el sistema enzimático

No obstante, las células hepáticas poseen un último recurso para evitar la producción de compuestos dañinos en el organismo, la glutatona (GSH) es un tripéptido azufrado que reacciona con el NAPQI y produce ácido mercaptúrico que es desechado por acción de los riñones^[4] pero, existe la posibilidad de que la concentración de NAPQI sea demasiado elevada y no pueda ser eliminada por el organismo. El NAPQI genera especies oxigenadas altamente reactivas como aniones superóxidos (O_2^-) los cuales producen oxidación acelerada de las células hepáticas^[4], provocando la muerte celular en el hígado. Este proceso se denomina necrosis hepática y es una causa potencial de la muerte del individuo. La producción de especies O_2^- se debe a que el mecanismo de reacción para la transformación de acetaminofén a NAPQI incluye un proceso redox^[5].

1.5 Fenilefrina

La fenilefrina es un compuesto orgánico empleado para aliviar la congestión nasal y como componente activo en soluciones oftalmológicas^[6]. La figura 4 es una representación de la estructura molecular:

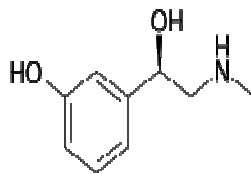


Figura 4. Estructura de la Fenilefrina

Este compuesto se usa frecuentemente como descongestionante y se expende en diferentes formas comerciales tales como gotas nasales (descongestión nasal) y gotas oculares (descongestión ocular) ^[6]. También, es utilizado en soluciones oftalmológicas para inducir la hemostasis en intervenciones quirúrgicas vía laser ^[6].

Anteriormente, se empleaba como agente dilator de las pupilas para facilitar la visualización de la retina ^[2], pero con el tiempo fue descartado para esta función debido a sus efectos colaterales en el sistema cardiovascular.

1.6 Farmacocinética de la Fenilefrina

La fenilefrina es un compuesto antagonista alfa-adrenoreceptor, es decir, es una sustancia capaz de unirse a un receptor y provocar una respuesta en la célula ^[2]. Tras su administración tópica sobre la mucosa nasal, actúa directamente sobre los receptores alfa-1, dando lugar a una vasoconstricción de las arteriolas, disminuyendo el contenido de sangre y la inflamación de la mucosa ^[2], lo que produce un efecto descongestionante de las vías nasales.

1.7 Contraindicaciones de la ingesta de Fenilefrina

Este fármaco se debe emplear con precaución en pacientes de edad avanzada o que sufran de enfermedades cardiovasculares, ya que tiene efectos perjudiciales sobre el sistema cardiovascular ^[6] tales como: hipertensión, taquicardia y otros problemas relacionados con el mal funcionamiento del corazón. Es por ello que se utiliza en una concentración de 10% v/v en soluciones oftalmológicas para intervenciones quirúrgicas vía láser, donde se prescribe utilizar una gota del medicamento por cada hora. En cambio, en gotas nasales se encuentra en una concentración de 0,12 % v/v ya que se requiere de dosis repetidas del producto farmacéutico ^[6].

En niños recién nacidos, se han reportado problemas tan graves como edema pulmonar ^[6]. Por ello, se utiliza como último recurso ya que existen otros productos que pueden ser más seguros aunque no tan eficientes como la

fenilefrina ^[6]. A su vez, es importante resaltar que el uso de fenilefrina en soluciones pediátricas es restrictivo debido a la incertidumbre alrededor de la dosis correcta suministrada.

1.8 Clorfeniramina

Este compuesto químico se encuentra comercialmente disponible como maleato de clorfeniramina, actúa como un agente antihistamínico dentro del organismo, por lo cual se usa comúnmente para prevenir condiciones alérgicas como rinitis y urticaria, las cuales forman parte de los síntomas del resfriado común. También, muestra efectos sedativos ^[2].

En este trabajo, se estudió la separación cromatográfica de la clorfeniramina por presentarse como parte de la composición química de la fórmula farmacéutica seleccionada. Sin embargo, los productos de degradación de la clorfeniramina aún no se encuentran bien definidos debido al poco conocimiento que se tiene sobre la ruta de degradación más probable para este compuesto, por lo cual en este trabajo sólo se ofrece la separación cromatográfica para dicho compuesto.

En este orden de ideas, el acetaminofén y la fenilefrina son compuestos de gran interés para la industria farmacéutica debido a sus diversas bondades biológicas. Sin embargo, pueden sufrir transformaciones químicas que los conviertan en otros compuestos dañinos para la salud del paciente. Adicionalmente, esto se traduce en la disminución de la eficiencia del medicamento. De allí la gran importancia de ejercer un estricto control de calidad sobre la cantidad de los componente activos, y a su vez, estudiar y cuantificar sus posibles productos de degradación, lo cual será tratado a continuación.

1.9 Productos de Degradación

El acetaminofén es una molécula muy estable químicamente, por lo cual es necesario forzar la degradación de este compuesto químico en un medio ácido o básico a una temperatura determinada ^[7]. La figura 5 muestra uno de los posibles mecanismos de degradación del acetaminofén. Los productos de degradación son el 4-aminofenol y el ácido acético. Debido a que ambos compuestos se producen en muy bajas cantidades, es importante resaltar que a estas concentraciones la formación de ácido acético no es nociva para el organismo. No obstante, el 4-aminofenol es conocido por presentar un efecto mutagénico y teratogénico dentro del organismo ^[2]. Adicionalmente, el sistema enzimático puede oxidar este compuesto a 4-nitrofenol, compuesto químico conocido por inducir la metahemoglobinemia ^[2]. No obstante, el 4-aminofenol y el ácido acético no fueron seleccionados como los productos de degradación para el acetaminofén debido a las fuertes condiciones de reacción que se requieren para la formación de estos compuestos a partir del acetaminofén ^[7].

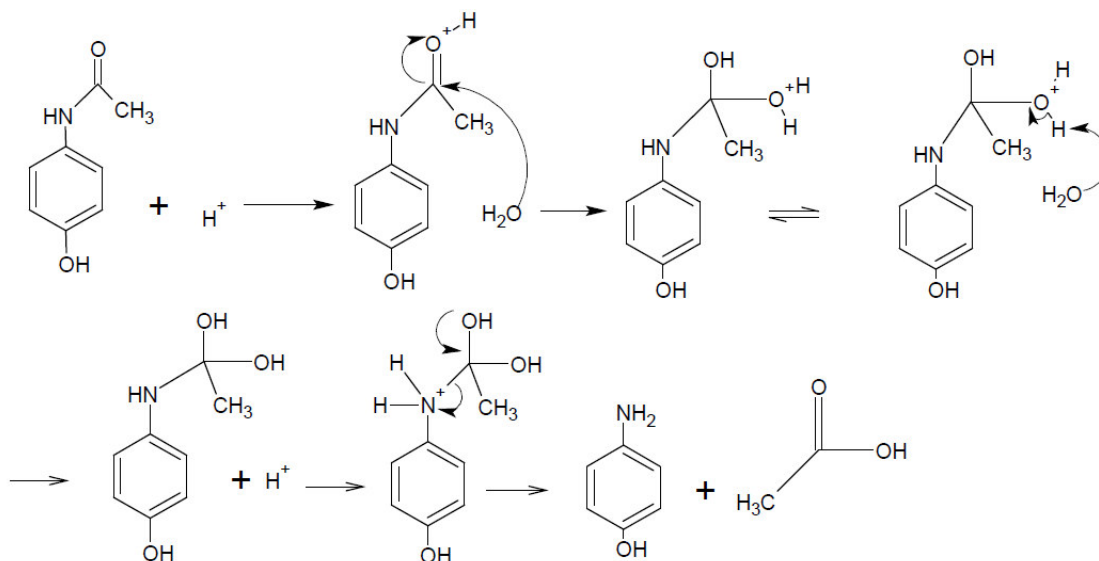


Figura 5. Mecanismo de Degradación del Acetaminofén

En cambio, los productos de degradación reportados por David Potter *et. al.* ^[8] fueron seleccionados porque requieren condiciones suaves de formación.

Por lo tanto, son más fáciles de sintetizar y tienen mayor probabilidad de formación en el ambiente químico en el cual se encuentra un producto farmacéutico comercial. La figura 6 muestra la estructura molecular de ambos dímeros, productos de degradación propuestos en este trabajo:



Figura 6. Estructura Molecular de los dímeros del Acetaminofen

Por otro lado, la fenilefrina es un compuesto muy inestable y puede sufrir de degradación química bajo diferentes condiciones de reacción. En la literatura se han reportado diferentes productos de degradación de la fenilefrina, la figura 7 muestra dos de los posibles productos de degradación para este compuesto ^[9]. A la izquierda se observa el producto de la interacción entre el ión maleato proveniente de la clorfeniramina y la fenilefrina, mientras el compuesto de la derecha se ha encontrado en formulaciones farmacéuticas que poseen fenilefrina y maleato de dexbromofeniramina. La toxicidad de ambos compuestos no ha sido reportada en la literatura pero se sabe que disminuyen la eficiencia del medicamento ^[9].

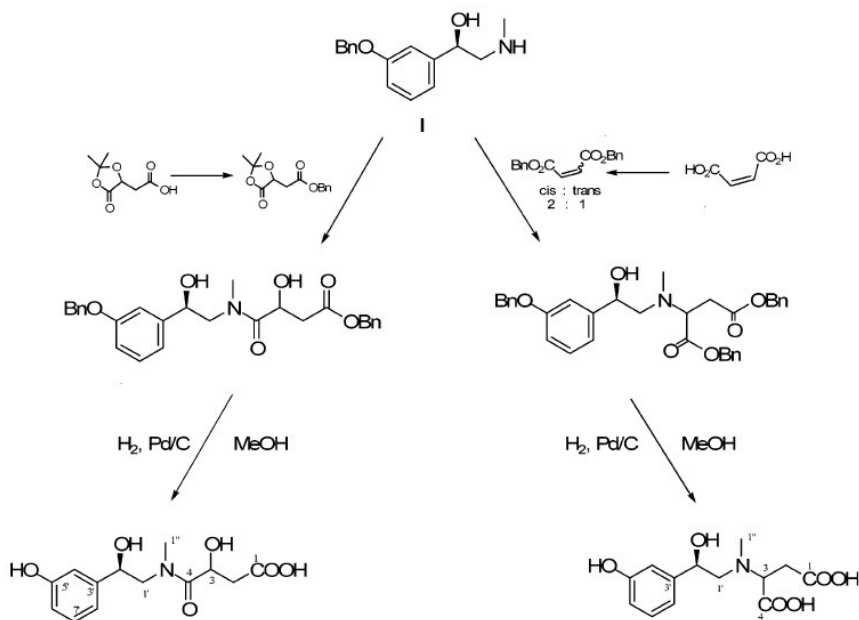


Figura 7. Productos de Degradación de la Fenilefrina

Es importante resaltar que en este trabajo de investigación no se estudiaron los productos de degradación antes mencionados debido a que aún no se conoce la ruta de síntesis para la formación del producto de degradación ubicado a la izquierda de la figura 7. Mientras que el otro compuesto no es relevante a la composición estudiada debido a que el maleato de dexbromofeniramina no forma parte de la composición. Por otro lado, los productos de degradación reportados por Hagen Trommer *et. al.* ^[10] (figura 8) además de ser relevantes en términos de la composición a estudiar, la síntesis de los mismos se puede realizar con relativa facilidad y con una conversión del 100% respecto al componente activo, sin la necesidad de condiciones severas de reacción. En la figura 8, el compuesto de la izquierda se conoce como ciclación en la posición “para” del anillo fenólico (p-pc, *para-phenolic ciclyzation*) y el compuesto de la derecha se conoce como ciclación en la posición “orto” del anillo fenólico (o-pc, *ortho-phenolic ciclyzation*). A partir de este momento, se les denominará como “p-pc” al compuesto de la izquierda y “o-pc” al compuesto de la derecha.

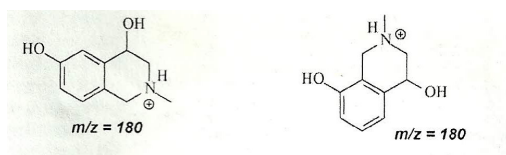


Figura 8. Estructura Molecular de los ciclos fenolicos de la fenilefrina

En este orden de ideas, hasta ahora se ha visto la importancia del acetaminofén y la fenilefrina como componentes activos. Sin embargo estos compuestos pueden degradarse en otras sustancias, disminuyendo la eficiencia del medicamento y en algunos casos perjudicando la salud del paciente. Por esta razón, es importante el desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de estas sustancias. Lo cual se tratará en la siguiente sección.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Técnicas de uso común en la separación de activos en la industria farmacéutica

La técnica de separación analítica de mayor uso en la industria farmacéutica es la Cromatografía Líquida en Fase Reversa ó RPLC, esto se debe a la alta robustez de la técnica y simplicidad del instrumental.

En esta sección se tratarán los aspectos más importantes de dicha técnica.

2.1.1 Cromatografía Líquida en Fase Reversa ó RPLC

La RPLC es la técnica cromatográfica de mayor uso a nivel mundial, posee una gran versatilidad y aplicabilidad en los trabajos analíticos rutinarios de carácter industrial y académico ^[11]. Esto ha favorecido la comercialización de equipos electrónicos basados en esta técnica analítica.

Entre las columnas más utilizadas en RPLC se encuentra la C₁₈, cuya fase estacionaria está compuesta por una cadena lineal de 18 átomos de carbono. Las columnas de RPLC tienen diámetros internos que oscilan entre 1 y 4,6 mm y se rellenan con partículas de tamaño de 1,7 µm (Ultra Performance Liquid Chromatography) a 10 µm. Su longitud es de 2,5 a 30 cm, las columnas más cortas presentan la ventaja de la rapidez y el mínimo consumo de solvente. La última propiedad es considerablemente importante puesto que los solventes de alta pureza que se requieren en RPLC son muy costosos ^[11].

2.1.2 Componentes del equipo de RPLC

Un aparato moderno de RPLC por lo general está equipado con cuatro (4) recipientes de vidrio donde están contenidos los disolventes que componen la fase móvil, cada uno contiene entre 200 a 1000 mL de disolvente. Estos recipientes se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos que

interfieren en el análisis ya que forman burbujas en la columna y en el detector [11]. En el caso del equipo de RPLC que será utilizado en esta investigación, se cuenta con un sistema de degasificación en línea pero, también se dispone de bombas de vacío para pre-degasificación y filtros *millipore*. El previo filtrado con vacío elimina el particulado en suspensión y cierta porción de los gases disueltos en los disolventes. En la figura 9, se representa un esquema de los componentes de un equipo de RPLC:

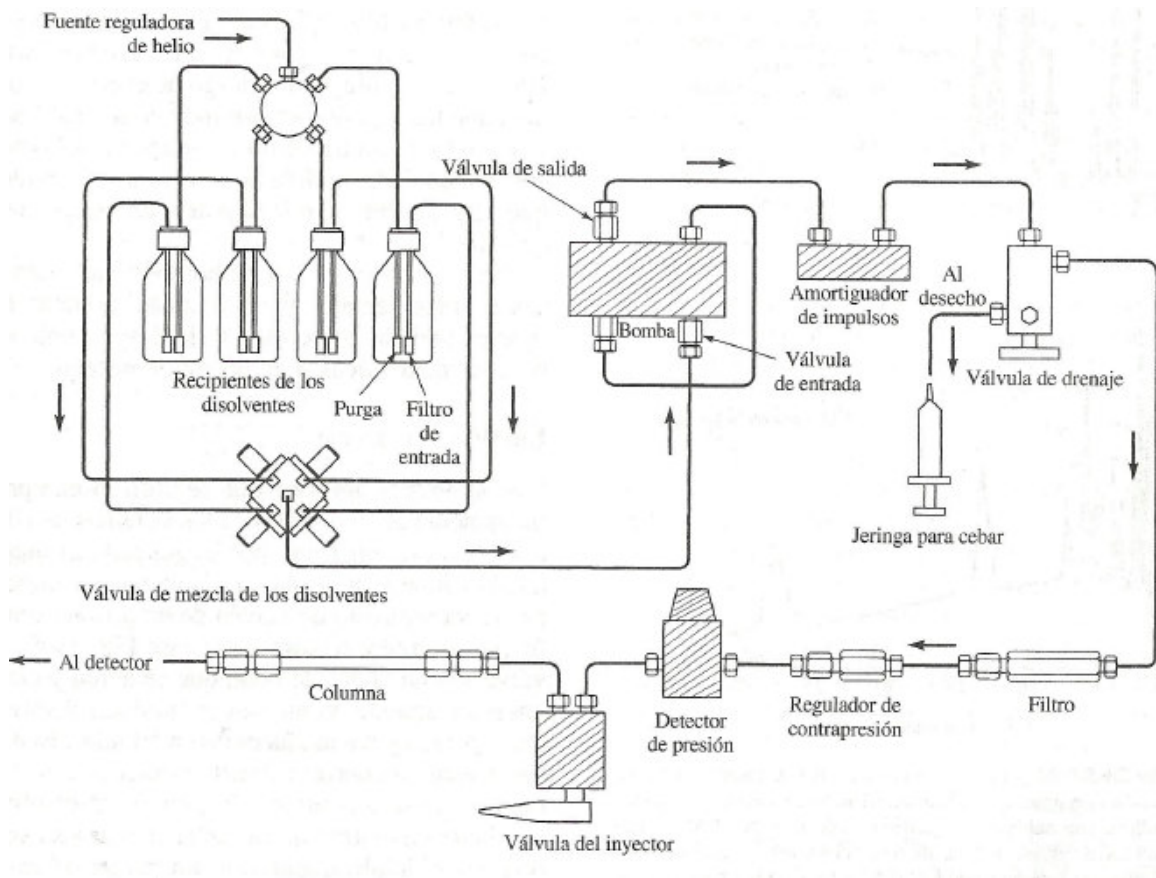


Figura 9. Componentes del equipo de HPLC

Adicionalmente, se cuenta con una válvula de mezcla de disolventes y con una bomba recíproca, que consta de una pequeña cámara en la que el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor de arrastre, como se muestra en la figura 10. La introducción de fase

móvil a la columna es producto del movimiento de vaivén de dos válvulas con cierre de bola, que se abren y cierran alternativamente, controlan el flujo del disolvente hacia afuera y hacia adentro de un cilindro, por lo que el disolvente está en contacto directo con un pistón ^[11]. A pesar de que las bombas recíprocas tienen la desventaja de producir un flujo pulsado, entre las ventajas se pueden citar sus altas presiones de salida (por encima de los 10000 psi), su fácil adaptación a la elución con gradiente y sus caudales constantes, que son prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad del disolvente ^[11].

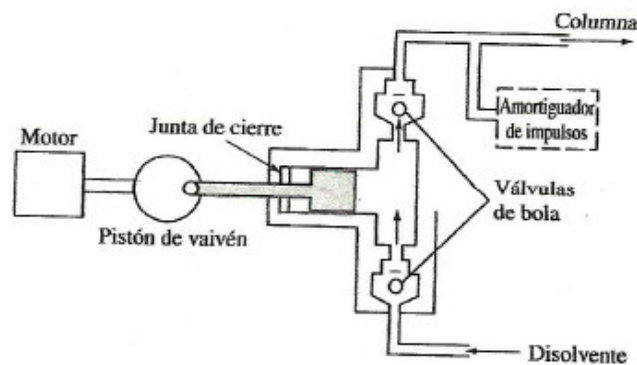


Figura 10. Bomba recíproca de HPLC

El instrumento empleado en este estudio cuenta con un amortiguador de impulsos, una válvula de drenaje, un filtro, un regulador de contrapresión, un detector de presión (el cual digitaliza el valor de la presión en una pantalla electrónica) pero no cuenta con una válvula de inyección manual como se muestra en la figura 9. En su lugar, cuenta con un sistema de inyección automatizado.

2.2 Técnicas de Detección

2.2.1 Espectroscopia de Absorción Molecular UV-Visible

La absorción molecular UV-Visible se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, en este caso la materia esta representada por las moléculas orgánicas de interés. Estas interacciones se deben a la excitación de los electrones que se encuentran en los diferentes tipos de orbitales moleculares, los cuales son designados como sigma (σ), antienlazantes (n) y pi (π) ^[12], cada uno de ellos posee un orbital molecular antienlazante σ^* , n^* y π^* según la teoría de orbitales moleculares ^[13].

Asimismo, las excitaciones electrónicas de interés son las transiciones permitidas por la mecánica cuántica ya que estas generan el mayor coeficiente de absortividad molar ^[12,13]. Es por ello que se utilizará un detector de arreglo de diodo (PDA), el cual permite la medición simultánea de los analitos a su máxima longitud de onda de respuesta ^[14]. Este tipo de detector cuenta con una fuente continua de radiación, una celda por donde circula la muestra, un divisor de longitudes de onda y una red de dispersión la cual dirige la radiación dispersada directamente sobre el arreglo de diodos ^[14]. La figura 11 muestra el detector PDA:



Figura 11. Detector de arreglo de diodo

Debido a la sencillez del equipo y la rápida adquisición de datos, el detector de arreglo de diodo es uno de los instrumentos analíticos que con mayor frecuencia se usan en el análisis de multicomponentes en la industria farmacéutica en general ^[14].

2.3 Antecedentes

Lotfi Monser y Frida Darghouth ^[7] trabajaron en el 2002 con el desarrollo y la validación de un método de RPLC para la determinación de paracetamol y sus productos de degradación en formulaciones farmacéuticas. En este trabajo se utilizó una columna PGC (Porous Graphitized Carbon, por sus siglas en inglés), un detector de arreglo de diodo (PDA, por sus siglas en inglés) y elución isocrática con acetonitrilo-búfer de fosfato ácido de potasio en una relación 80:20 (v/v). Se empleó un rango de soluciones de trabajo para el paracetamol de (1 – 50) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Debido a la alta estabilidad del paracetamol, estos investigadores forzaron la degradación de 100 mg del compuesto con 20 mL de ácido sulfúrico (4M) en un baño de agua calentando a 50 °C por 30 minutos. Confirmaron la presencia de una señal cromatográfica referente al 4-aminofenol y otra a la 4-cloroacetanilida, este último no es un producto de degradación del paracetamol pero es un contaminante proveniente del proceso de manufactura. Además, estudiaron el efecto del modificador orgánico en la elución cromatográfica, llegando a la conclusión que el uso de acetonitrilo generaba los mejores resultados, como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Coeficiente de retención para cada compuesto según el modificador orgánico

Compounds	THF/buffer 40/60	ACN/buffer 80/20	MeOH/buffer 80/20
4-Aminophenol	0.04	0.33	0.53
Paracetamol	0.39	0.97	4.46
4-Chloroacetanilide	3.14	4.88	17.08

Por último, observaron el comportamiento cromatográfico de los analitos con el uso de una columna ODS (Octadecylsiloxan, por sus siglas en inglés). En comparación con la columna ODS, la ventaja de utilizar una columna PGC es la rápida obtención de resultados (7,5 minutos) mediante elución isocrática, lo cual

resulta adecuado para procesos rutinarios como el control de calidad. A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos con el uso de cada fase estacionaria:

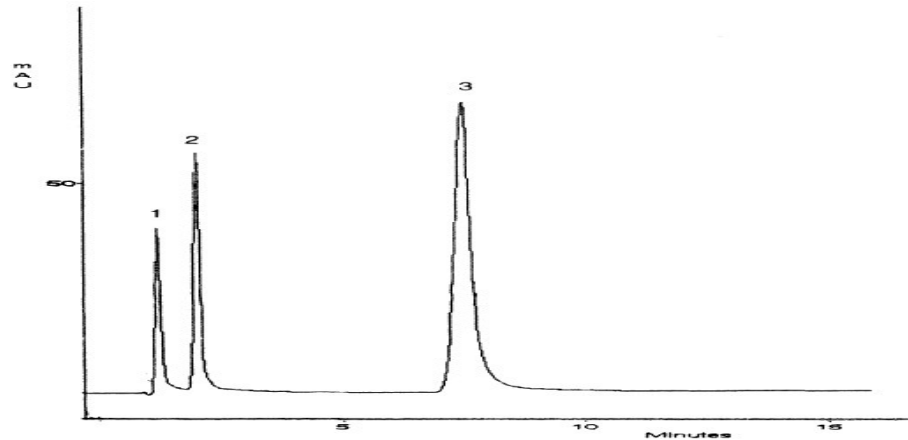


Figura 12. Cromatograma obtenido con el uso de la columna PGC. Compuesto 1: 4-aminofenol, 2: Paracetamol, 3: 4-cloroacetanilida

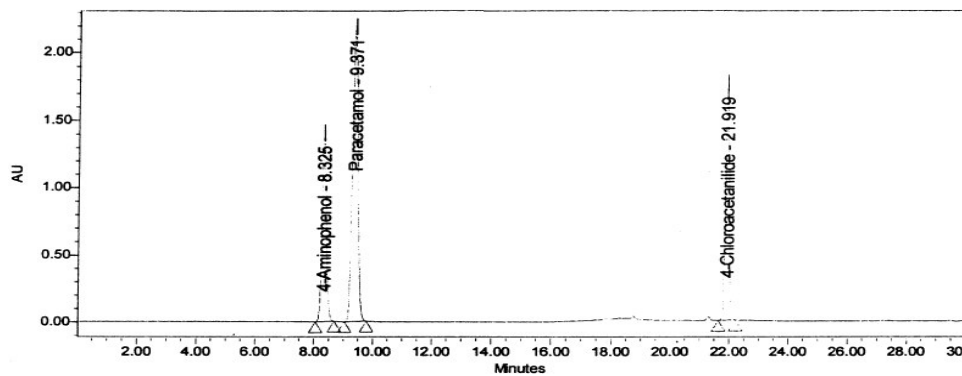


Figura 13. Cromatograma con la columna ODS

Garcia *et al.* ^[15] en el 2003, desarrollaron y validaron un método de RPLC con el uso de elución isocrática para la determinación de acetaminofen, clorfeniramina y fenilefrina así como las impurezas relacionadas a estos compuestos en cápsulas como forma farmacéutica. Para ello usaron las condiciones cromatográficas mostradas en la tabla 2:

Tabla 2. Condiciones Cromatográficas del Método desarrollado por García *et. al.* ^[15]

Tipo de fase estacionaria: Columna de Polietilenglicol
Detector UV: 310nm para el acetaminofén
Fase móvil: Solución Amortiguadora de fosfato (20mM): acetonitrilo (90:10, v/v)

Se utilizó una columna con características polares, la cual les permitió realizar una elución cromatográfica en un tiempo de aproximadamente 13 minutos, eligieron este tipo de columna debido a la gran diferencia de polaridad de los analitos.

En resumen, estos investigadores obtuvieron excelentes resultados con el uso de una columna de polaridad mixta y la técnica de Cromatografía Líquida en fase reversa. En la figura 14 se representa el cromatograma obtenido.

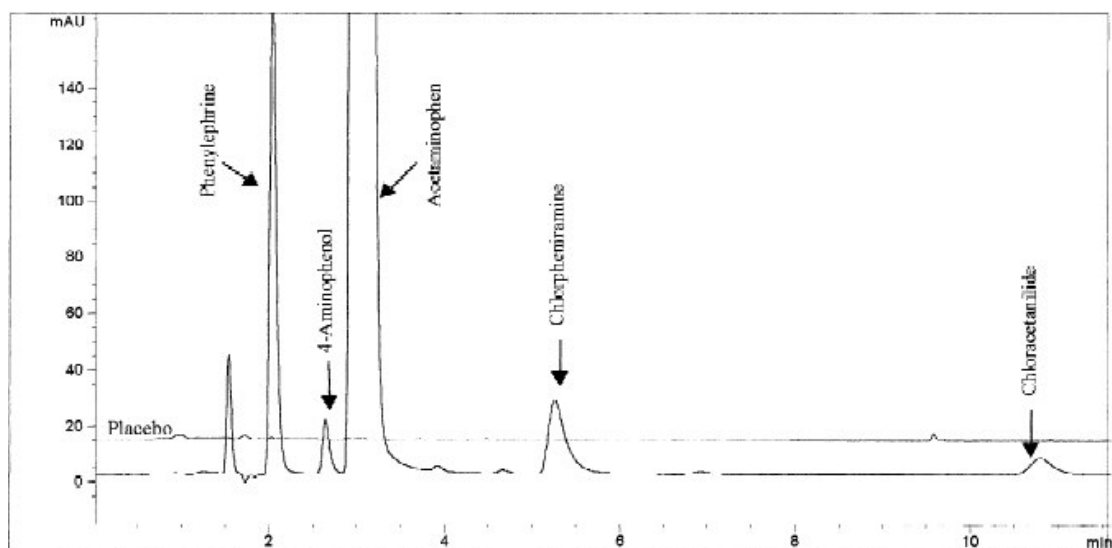


Figura 14. Cromatograma obtenido con la columna de Polietilenglicol

B. Olmo *et al.* ^[16] en el 2005, investigaron el efecto de un gradiente de pH a composición constante de modificador orgánico con el objetivo de separar acetaminofen, fenilefrina y maleato de clorfeniramina como componentes activos en formulaciones farmacéuticas para el resfriado común. Además, lograron la separación de los productos de degradación, p-aminofenol, p-nitrofenol y p-

cloroacetanilida en una muestra sintética. Para ello emplearon dos métodos cromatográficos, la diferencia entre los métodos se encuentra en la fase estacionaria y la fase móvil, como se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Fases Estacionarias y Móviles empleadas por B. Olmo *et. al.* ^[16]

Especificación	Método 1	Método 2
Tipo de Columna	Discovery Cyanopropyl	Zorbax SB-CN
Fase Móvil	H ₃ PO ₄ /Acetonitrilo 95:5	H ₃ PO ₄ /Acetonitrilo 96:4

Como se observa en la figura 15, el primer método no fue específico. Sin embargo, la columna tipo Zorbax SB-CN fue capaz de separar todos los compuestos de interés (figura16) debido a que ofrece una mejor separación para muestras con un rango variable de polaridades como en este caso. Finalmente, la importancia de este trabajo de investigación radica en el uso de un gradiente de pH obtenido a través de la optimización mediante un modelo matemático ^[17] en lugar de la clásica optimización mediante ensayo y error experimental.

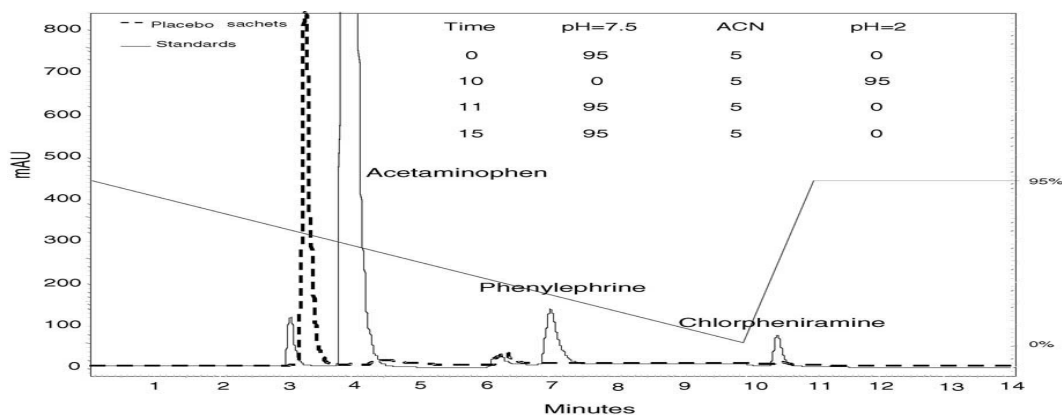


Figura 15. Cromatograma obtenido por el método 1, sólo se logró la separación de los componentes activos.

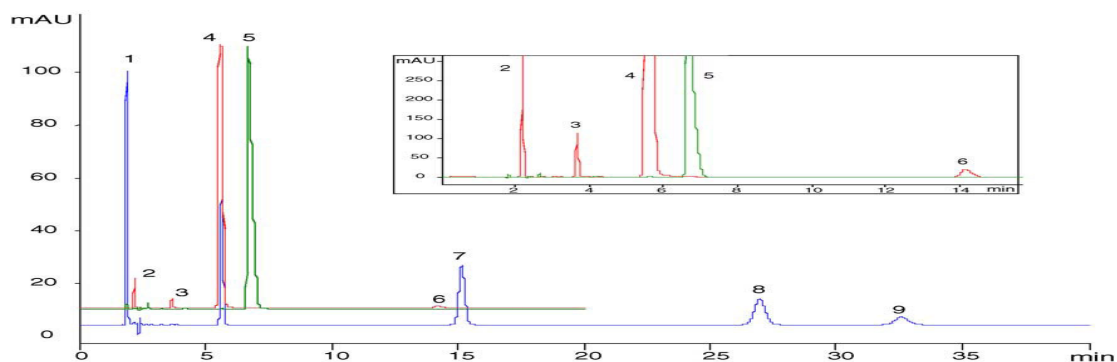


Figura 16. Cromatograma obtenido con el uso de una columna Zorbax SB-CN. 1) p-aminofenol, 2) fenilefrina, 3) maleato, 4) acetaminofen, 5) sacarina, 6) clorfeniramina, 7) p-nitrofenol, 8) p-cloroacetanilida, 9) acetanilida.

A Marín *et al.* ^[18] en el 2005, analizaron un producto de degradación, mediante el uso de técnicas analíticas como la Extracción en Fase Sólida, Cromatografía Líquida en Fase Reversa y otras técnicas espectroscópicas como la Absorción Molecular UV-Visible, RMN- H^1 , RMN- C^{13} y espectrometría de masas. El producto de degradación fue encontrado en un estudio de estabilidad química en un producto farmacéutico que contenía acetaminofen, fenilefrina y maleato de clorfeniramina. La figura 17 muestra el cromatograma obtenido.

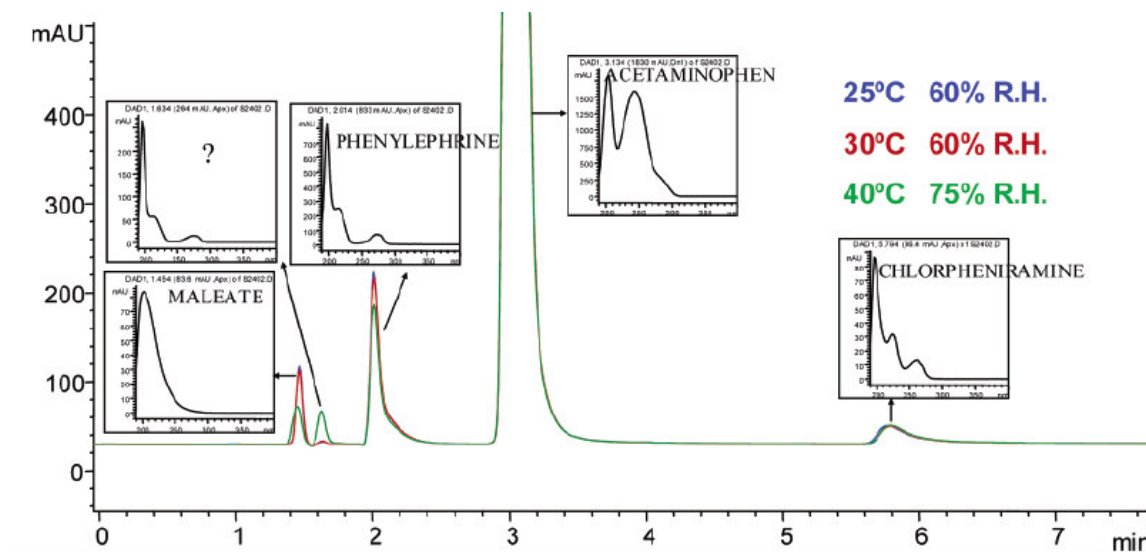


Figura 17. Cromatograma obtenido en el sexto mes del estudio de estabilidad química. Condiciones Cromatograficas: Columna PEG (150x4.6 mm, 5 μ m), fase movil compuesta por solucion amortiguadora de fosfato (20 mM)/acetonitrilo a pH 7 en una relacion 90:10 y un flujo de fase movil de 1 mL min⁻¹ (35 °C)

Para determinar la masa molecular de la sustancia desconocida, utilizaron un espectrómetro de masas acoplado a un equipo de RPLC. Propusieron dos isómeros como posibles moléculas (figura 18). Ambos isómeros provienen de la interacción iónica de la fenilefrina con el maleato proveniente de la clorfeniramina, es por ello que el producto de degradación posee una polaridad parecida a estos compuestos. Por tal motivo, utilizaron la técnica de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) y la RPLC para separar el producto de degradación. Posteriormente, emplearon técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear de protones (RMN- H^1), de carbono (RMN- C^1) y técnicas más avanzadas como la resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (COSY-HMBC-HSQC) para elucidar la molécula, la figura 19 muestra el resultado obtenido mediante RMN- H^1 . Con el uso de técnicas cromatográficas y espectroscópicas, estos investigadores lograron identificar el isómero B como un producto de degradación que no había sido reportado previamente en la literatura.

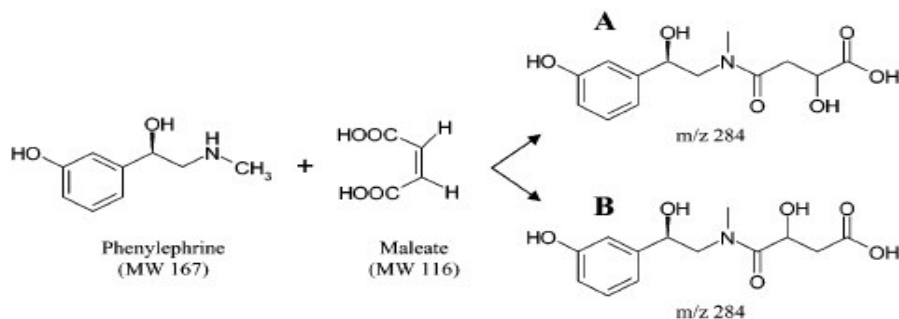


Figura 18. Moléculas Propuestas

atom	¹ H chemical shift (ppm)	¹³ C chemical shift (ppm)
1		186.1
2a	2.77	36.9
2b	2.89	
3	4.18	70.5
4		174.8
1'a	3.40	63.2
1'b	3.62	
2'	5.14	70.6
3'		144.4
4'	6.95	115.9
5'		158.9

Figura 19. Resultado obtenido mediante la técnica de RMN-¹H

En conclusión, la técnica analítica de RPLC se emplea con frecuencia para la cuantificación de componentes activos y sustancias afines en medicamentos. Una de las razones es la fácil adaptación de esta técnica en la separación de compuestos polares, los cuales forman parte del 90% de los compuestos químicos utilizados en la actualidad por la industria farmacéutica. El desarrollo de métodos analíticos de separación, responde a la creciente necesidad por ofrecer productos farmacéuticos más eficientes y con menor repercusión sobre la salud del paciente, lo cual es la esencia de los rigurosos controles de calidad en la industria farmacéutica. Por esta razón, en este trabajo de investigación se plantea el desarrollo de un método analítico mediante modelado cromatográfico para la separación simultánea de acetaminofen, fenilefrina y sus posibles productos de degradación, además de clorfeniramina, en una muestra sintética. Luego se estudia la aplicabilidad de este método en un producto farmacéutico seleccionado.

2.4 Justificación

En la actualidad existen muchas casas farmacéuticas que ofrecen sus productos para el alivio o tratamiento de diversas patologías, por lo cual hay un gran número de medicamentos disponibles en los anaqueles comerciales. Por esta razón, los organismos regulatorios de cada país están siendo más estrictos en el cumplimiento de ciertos parámetros de calidad para el registro de los productos farmacéuticos.

Por tal motivo, hoy en día es necesario desarrollar métodos de separación analítica para la cuantificación de componentes activos y sus posibles productos de degradación. De allí la importancia que tiene para la industria farmacéutica el desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación simultánea de los compuestos químicos de interés.

Debido que hasta ahora no se ha reportado en la literatura un método analítico para la separación simultánea de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina como componentes activos, dimeros del acetaminofén, o-pc y p-pc como productos de degradación de la fenilefrina. En el presente trabajo se plantea el desarrollo de un método cromatográfico para la determinación simultánea de estos siete compuestos. Sin embargo, el método clásico de optimización univariante no es adecuado para estos fines debido al largo periodo de tiempo que se requiere para encontrar las condiciones cromatográficas deseadas. Es por ello que en este trabajo de investigación se utilizará un software que permite la optimización de las condiciones cromatográficas en la cromatografía líquida tomando en cuenta parámetros multivariantes interdependientes, lo cual permite reducir el tiempo invertido por el analista en la búsqueda de las condiciones cromatográficas deseadas y ahorrar el consumo de reactivos y solventes empleados para encontrar dichas condiciones.

3. Objetivos

Objetivo General

- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación simultánea de acetaminofén, fenilefrina y sus productos de degradación, además de clorfeniramina, en muestras sintéticas, las cuales simulan formulaciones farmacéuticas comerciales.

Objetivos Específicos

- Optimizar las condiciones de separación cromatográficas en fase líquida mediante el uso de estándares de referencia y un software especializado (OptichromLC) en el modelado de la cromatografía líquida en fase reversa.
- Validación del método analítico mediante el uso de figuras de mérito, tales como especificidad, intervalo lineal de respuesta, linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, exactitud y precisión.
- Aplicación del método cromatográfico optimizado al monitoreo de componentes activos (acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina) y productos de degradación (Dimeros, o-pc y p-pc) en una muestra farmacéutica seleccionada.

4. Procedimiento Experimental

Con la finalidad de obtener la separación cromatográfica de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina y los posibles productos de degradación del acetaminofén y la fenilefrina, se propusieron diferentes tipos de fase móvil como parámetro determinante en el control de la selectividad. Entre los solventes orgánicos empleados en cromatografía líquida en fase reversa se encuentran el acetonitrilo, metanol y el tetrahidrofurano ^[19]. De estos, el metanol y el acetonitrilo fueron utilizados como modificadores orgánicos debido a que brindan una polaridad intermedia para un método cromatográfico destinado a la separación de compuestos con un rango variable de polaridades. Por otra parte, en la literatura ^[19] se recomienda que los solventes antes mencionados se usen en el siguiente orden, acetonitrilo > metanol > tetrahidrofurano. Sin embargo, se prefirió trabajar en un orden diferente, metanol > acetonitrilo, debido a la crisis mundial de acetonitrilo ^[20], la cual redujo la disponibilidad y aumentó el costo de éste solvente, lo cual lo hace poco viable para el uso rutinario en la industria. Adicionalmente, se prescindió del uso de tetrahidrofurano debido a que presenta ciertas desventajas tales como una absortividad considerable en la región baja del UV (212 nm), reactividad en presencia de oxígeno y un lento equilibrio del sistema cuando se cambia la composición de la fase móvil ^[19].

También, se investigó el efecto de dos soluciones acuosas en el comportamiento cromatográfico de los analitos de interés, una solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio a diferentes valores de pH y una solución de tetraborato de sodio.

Seguidamente, se detallará el procedimiento experimental según las pautas establecidas anteriormente.

4.1 Instrumentación

Tabla 4. Instrumentación

Instrumento	Marca	Modelo
Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia	Waters	Alliance 2695
Detector de Arreglo de Diodo	Waters	2996
Columna Cromatográfica en Fase Reversa	Waters Xbridge	Fase estacionaria C18, 150 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, 3,5 μm de tamaño de partícula
Columna Cromatográfica en Fase Reversa	Waters Xbridge	Fase estacionaria C18, 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, 3,5 μm de tamaño de partícula
Filtro Desionizador	Millipore	Milli-Q ⁵⁰
Filtros Porosos	Acrodisc	25 mm de diámetro, poros de 45 μm
Vial de Vidrio Enroscable	Agilent Technology	1,5 mL de capacidad
Tapa para viales de vidrio Enroscable	Agilent Technology	Septum de Politrifluoro de etileno (PTFE)



Figura 20. Cromatógrafo Líquido de Alta eficiencia (HPLC)



Figura 21. Filtro Millipore

4.2 Reactivos

Tabla 5. Reactivos

Reactivos	Marca	Especificación	Pureza (%)
Metanol	Merck	Grado HPLC	N/A
Acetonitrilo	Fisher Scientific	Grado HPLC	N/A
Agua	Millipore	Milli-Q ⁵⁰	N/A
Etanol	Riedel De-Haën	Grado HPLC	99 v/v
Formaldehido	Fisher Scientific	Grado HPLC	37 m/v
Amoniaco	Merck	Grado HPLC	25 v/v
Formiato de Amonio	Sigma Aldrich	Grado HPLC	97
Tetraborato de Sodio Decahidratado	Riedel De-Haën	Grado USP	99,5
Acetaminofén	Mallinckrodt	Grado USP	99,9
Hidrocloreto de Fenilefrina	Iwaki Seiyaku Co.	Grado USP	99,8
Maleato de Clorfeniramina	Kongo Chem.	Grado USP	99,9

4.3 Búsqueda de las Condiciones Cromatográficas

En esta primera etapa, se optimizan las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina, dimeros del acetaminofén, o-pc y p-pc (productos de degradación de la fenilefrina).

4.3.1 Preparación de Patrones de Referencia

4.3.1.1 Hidroclorato de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina

Se preparó una disolución estándar de fenilefrina, maleato de clorfeniramina y acetaminofén a una concentración aproximada de 0,1 mg/mL respectivamente, para ello se empleó una solución al 10% v/v de etanol como solvente.

4.3.2 Preparación de los Productos de Degradación

4.3.2.1 Productos de Degradación del Acetaminofén

Se pesó 2,0 gramos de acetaminofén y se disolvieron en 100 mL de disolución al 10% v/v de etanol. Esta disolución se calentó durante cinco (5) días a 95°C. Luego, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente.

4.3.2.2 Productos de Degradación de la Fenilefrina

Se pesó 0,3 gramos de fenilefrina y se disolvieron en 100 mL de agua desionizada grado Milli-Q ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-2}$). Se tomó una alícuota de 25 mL de esta disolución y se disolvió en 100 mL de disolución al 1% v/v de formalina. Se dejó reaccionar durante seis (6) horas.

4.3.3 Preparación de la Muestra Sintética

En este trabajo se denomina “muestra sintética”, a la mezcla de disoluciones estándar y productos de degradación que fue utilizada para el desarrollo del método cromatográfico. Para ello, se tomaron alícuotas

representativas de cada una de las soluciones y se agregaron en un vial para inyectar directamente en el equipo cromatográfico.

4.3.4 Modelado y Optimización del método analítico mediante OptichromLC

4.3.4.1 Uso del Software (OptichromLC)

El software empleado en este trabajo tiene como nombre “OptichromLC”, es propiedad intelectual de Procter and Gamble Industrial y aún no ha sido patentado por la compañía. Este software utiliza un algoritmo generalizado de gradiente reducido ^[21], lo cual permite que el software sea empleado para el modelado de la cromatografía líquida en fase reversa a través de la construcción y evaluación de los perfiles de retención ($\log k$ Vs %B) de los analitos de interés, tomando en cuenta el comportamiento no lineal de cada analito y las ecuaciones fisicoquímicas de la teoría de separación en fase líquida ampliamente reportadas en diferentes textos especializados en este área ^[22].

El detallado registro de los tiempos de retención es importante porque permite la construcción de perfiles que son utilizados para minimizar el tiempo de corrida cromatográfica en función de un conjunto de variables que incluyen un valor aceptable de la constante de selectividad alfa (α), la cual debe ser aproximadamente 1,1. Esto se debe a que dicho valor garantiza una separación cromatográfica con una resolución mayor o igual a dos (2,0) entre el par crítico, con lo cual se asume que la integración individual de ambos picos toma en cuenta el 99,99% de sus áreas ^[22].

Adicionalmente, el software considera las dimensiones de la columna, las dimensiones de las tuberías del equipo cromatográfico y las condiciones de la corrida cromatográfica tales como el flujo de fase móvil, porcentaje de solvente orgánico empleado y máxima presión observada al momento de recopilar los datos cromatográficos. A su vez, éste posee la capacidad de analizar múltiples variables durante el proceso de la optimización cromatográfica.

Para la obtención de predicciones, es necesario registrar cuidadosamente los tiempos de retención de cada analito obtenidos experimentalmente mediante eluciones isocráticas de la muestra sintética a diferentes concentraciones de modificador orgánico. Por esta razón, se realizaron siete (7) eluciones isocráticas a diferentes concentraciones de modificador orgánico para cada sistema de separación evaluado. Cada inyección se hizo por duplicado y los tiempos de retención obtenidos se utilizaron como datos de partida para la optimización cromatográfica mediante el uso del software. Para ejecutar el modelado, el software es alimentado con las dimensiones y la temperatura de la columna, las dimensiones de las tuberías del equipo cromatográfico y la máxima presión observada con el solvente orgánico empleado. Seguidamente, se fija la resolución cromatográfica deseada y luego se ejecuta la optimización de ciertos parámetros cromatográficos, contemplando la variable “tiempo de elución” como variable de respuesta. Generalmente, los parámetros cromatográficos que se eligen son el flujo de fase móvil, la longitud de la columna y el porcentaje de modificador orgánico con que se inicia la corrida cromatográfica.

La principal ventaja de usar un programa de optimización multivariante es que se logra la obtención de la mejor predicción tomando en cuenta todos los parámetros que pueden afectar la cromatografía, en contraste con los programas empleados en décadas anteriores ^[23] en los cuales sólo se puede optimizar una (1) variable a la vez. Otra ventaja del software (OptichromLC) es que las predicciones teóricas se ajustan al resultado experimental con un porcentaje de certeza bastante elevado, gracias a la consideración de los efectos extra columna, tales como dimensiones de las tuberías, camino óptico del detector, entre otros.

Es importante resaltar que la optimización cromatográfica con el uso de OptichromLC toma un estimado de tres días por cada solvente orgánico utilizado o sistema de selectividad (entendido como el conjunto fase estacionaria +

solvente acuoso + modificador orgánico), a diferencia de la optimización univariable en la cual el analista debe emplear semanas y hasta meses para encontrar condiciones cromatográficas aceptables.

A pesar que el software empleado en este trabajo puede ahorrar el tiempo invertido en optimizar las condiciones cromatográficas, también puede generar predicciones incorrectas debido a las siguientes razones ^[24]:

- Preparación imprecisa de la fase móvil o ajuste del pH.
- No permitir que la columna se equilibre cuando la fase móvil se cambia.
- Picos cromatográficos desdoblados o con una simetría inaceptable.
- No realizar un ciclo de limpieza para facilitar la elución de analitos o sustancias afines a la fase estacionaria.
- Equivocación en la asignación de los picos cromatográficos al momento de realizar las eluciones isocráticas de la muestra sintética.

Con el fin de extraer sustancias que pudiesen permanecer retenidas en la columna, se realiza un ciclo de limpieza antes de iniciar cada elución isocrática. Además, la identificación de los picos cromatográficos se realiza mediante el monitoreo del espectro en el UV-Visible para cada molécula, siempre considerando que dichos espectros pueden sufrir variaciones a medidas que se cambia el pH de la fase móvil. Esto se hace con el fin de registrar datos correctos en el software.

Es importante mencionar que el software es una herramienta que disminuye el tiempo invertido por el analista en encontrar las condiciones cromatográficas más óptimas. No obstante, el analista debe tener un conocimiento previo de la técnica de cromatografía de líquidos en fase reversa debido a que el software funciona en base a los criterios establecidos por el analista. Es decir, el software no es un programa autosuficiente, es necesario la evaluación crítica del analista sobre las condiciones predichas por el software a lo largo del desarrollo y optimización del método cromatográfico.

Finalmente, si la optimización via software no se adapta a las necesidades experimentales, entonces el analista debe discernir que parámetros modificar (optimización reiterativa) con el fin de obtener soluciones teóricas que se adapten a sus necesidades. En este sentido, el analista debe tener una comprensión básica de todas las variables que afectan la cromatografía líquida en fase reversa. A medida que la experticia del analista en este área aumenta, existe mayor probabilidad de obtener condiciones cromatográficas optimizadas en un corto período de tiempo.

4.3.5 Medición de las Figuras de Mérito

Para la medición de las figuras de mérito tales como precisión, linealidad y especificidad del método se emplearon disoluciones estándar de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina, los dímeros del acetaminofén, o-pc y p-pc como productos de degradación de la fenilefrina. Mientras que otras figuras de mérito tales como exactitud, límite de cuantificación (LOQ) y límite de detección (LOD) se realizaron sobre placebos de la muestra. Debido a que no existen estándares de referencia comerciales para los dímeros del acetaminofen ni para los productos de degradación de la fenilefrina, es necesario conocer la concentración de cada uno de estos compuestos antes de realizar la medición de las figuras de mérito.

4.3.5.1 Concentración de los Productos de Degradación

4.3.5.1.1 Productos de Degradación del Acetaminofén (Dímeros)

Para conocer la concentración de los productos de degradación, se comparó el área cromatográfica de una disolución estándar de acetaminofén con el área cromatográfica obtenida para cada producto de degradación, lo cual se logró inyectando en el equipo cromatográfico una disolución de concentración conocida de acetaminofen y una alícuota, sin diluir, de la disolución que contiene

los productos de degradación del acetaminofén. Esto se hace asumiendo que el factor de respuesta relativo entre el producto de degradación y el acetaminofén es uno (1), procedimiento recomendado en la literatura para los casos en los que no existe un estándar de alta pureza para los productos de degradación [25,26].

4.3.5.1.2 Productos de Degradación de la Fenilefrina (o-pc, p-pc)

Para conocer la concentración de los productos de degradación, se comparó el área cromatográfica de una disolución estándar de fenilefrina con el área cromatográfica obtenida para cada producto de degradación, lo cual se logró inyectando en el equipo cromatográfico una disolución de concentración conocida de fenilefrina y una alícuota, sin diluir, de la disolución que contiene los productos de degradación de la fenilefrina. Esto se hace asumiendo que el factor de respuesta relativo entre el producto de degradación y la fenilefrina es uno (1), procedimiento recomendado en la literatura para los casos en los que no existe un estándar de alta pureza para los productos de degradación [25,26].

4.3.5.2 Figuras de Mérito

Las figuras de mérito evaluadas fueron la especificidad, linealidad, intervalo lineal de respuesta, límite de cuantificación (LOQ), límite de detección (LOD), precisión y exactitud.

4.3.5.2.1 Especificidad

La especificidad es la capacidad del método cromatográfico para asignar de manera inequívoca una respuesta a un analito en particular, en presencia de otros componentes. La especificidad del método se estudió empleando la muestra sintética. Como figura de mérito, se calculó el factor de resolución entre el par crítico, cuyo valor debe ser mayor o igual a dos (2,0).

4.3.5.2.2 Linealidad

Disoluciones de Acetaminofén

Se prepararon disoluciones estándar de acetaminofén a las concentraciones de 1,200; 1,600; 2,000; 2,400; 3,000 y 4,000 mg/mL. Estas concentraciones representan un rango de trabajo desde 60 hasta 200% de la concentración esperada del componente activo en la preparación de la muestra.

El criterio de éxito es la obtención de un coeficiente de determinación (r^2) mayor o igual a 0,990.

Disoluciones de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina

Se prepararon disoluciones estándar de ambos componentes activos a las concentraciones de 0,240; 0,320; 0,400; 0,480; 0,600 y 0,800 mg/mL. Estas concentraciones representan un rango de trabajo desde 60 hasta 200% de la concentración esperada de los componentes activos en la preparación de la muestra.

El criterio de éxito es la obtención de un coeficiente de determinación (r^2) mayor o igual a 0,990.

Curva de Linealidad para los productos de degradación

Se emplearon disoluciones estándar a las concentraciones de 1,20; 1,60; 2,00; 2,40; 3,00 y 4,00 $\mu\text{g/mL}$ para los productos de degradación del acetaminofén. Para los productos de degradación de la fenilefrina se utilizaron disoluciones estándar a las concentraciones de 2,40; 3,20; 4,00; 4,80; 6,00 y 8,00 $\mu\text{g/mL}$. Es importante resaltar que las concentraciones empleadas corresponden a porcentajes relativos a la cantidad del activo, establecidos por organismos internacionales como la ICH ^[25], los cuales indican que el método analítico debe ser capaz de cuantificar el producto de degradación al nivel de

0,05% de la concentración del componente activo en la muestra, de acuerdo con la dosis diaria del medicamento.

El criterio de éxito es la obtención de un coeficiente de determinación (r^2) mayor o igual a 0,990.

Intervalo Lineal de Respuesta

Para determinar este parámetro se inyectaron disoluciones estándar a concentraciones mayores a 200% y menores a 20% de la concentración de los componentes activos esperada en la preparación de la muestra, excepto para el acetaminofén, en el cual sólo se estudió la linealidad a concentraciones por debajo del 20% de la concentración de este activo en la preparación de la muestra. El criterio de éxito es la obtención de un coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,990$ para cada componente activo en el intervalo estudiado.

Cabe destacar que también se realizó un análisis gráfico de la curva de residuales en el intervalo de respuesta lineal, esto se hizo con el fin de observar si realmente existe una correlación lineal entre el área y la concentración.

4.3.5.2.3 Límite de Cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación fue calculado utilizando una relación señal-ruido igual a diez (10) ^[26,27] para el pico cromatográfico seleccionado. Esto se logró inyectando disoluciones estándar a diferentes concentraciones hasta conseguir señales cromatográficas con relación señal-ruido de aproximadamente diez. Cabe destacar que este estudio se realizó empleando placebos, es decir, el producto fue contaminado de manera controlada con los componentes activos y los productos de degradación propuestos.

Para todos los analitos de interés, se reporta la concentración determinada en el límite de cuantificación.

4.3.5.2.4 Limite de Detección

Para obtener este parámetro se utilizó la relación matemática en la cual el límite de detección (LOD) es aproximadamente tres veces menor al límite de cuantificación (LOQ), es decir, $LOD \sim LOQ/3$ ^[26,27]. Esto es justificable cuando consideramos el nivel de incertidumbre inherente a una señal del orden del límite de detección, típicamente de $RSD \sim 15-20\%$ ^[26,27].

Para todos los analitos de interés, se reporta la concentración estimada en el límite de detección.

4.3.5.2.5 Precisión

Se inyectaron por triplicado disoluciones estándar de cada analito al 100% de la concentración esperada en la muestra y se calculó el coeficiente de variación del área cromatográfica para las medidas. El criterio de aprobación es que el coeficiente de variación no debe ser mayor a 2% para los componentes activos ó mayor a 5% para los productos de degradación.

4.3.5.2.6 Exactitud

Se utilizaron placebos, se contaminaron deliberadamente bajo condiciones controladas, con concentraciones conocidas de cada uno de los analitos (80, 100 y 120% de la concentración del analito esperada en la preparación de la muestra). Posteriormente, se inyectaron tanto las disoluciones estándar de concentración conocida como las muestras contaminadas previamente. Finalmente, se compara la cantidad de contaminante añadido o esperado, versus la cantidad de contaminante recuperado. El criterio de éxito es la obtención de un porcentaje de recuperación de 95-105% para los componentes activos y 90-110% para los productos de degradación ^[25,26].

4.3.6 Muestra

El producto farmacéutico seleccionado se utiliza para aliviar los síntomas del resfriado común, por lo cual contiene acetaminofén (400 mg), fenilefrina (4 mg) y maleato de clorfeniramina (4 mg) como componentes activos de esta fórmula farmacéutica. Este producto se presenta en cápsulas como forma farmacéutica.

4.3.6.1 Preparación de la Muestra

Determinación de Acetaminofén y sus Productos de Degradación

Se tomó una cápsula del producto farmacéutico y se disolvió en un balón de 100 mL con disolución al 30% v/v de metanol. Esta disolución se llevó a ultrasonido durante quince (15) minutos y luego se filtró para la remoción del sólido suspendido en disolución. La disolución remanente se inyectó directamente en el cromatografo para la determinación de los productos de degradación del acetaminofén. Mientras que para la determinación del acetaminofén, se tomó una alícuota de 25 mL de esta última solución, se llevó a 50 mL con disolución al 30% v/v de metanol y se inyectó directamente en el equipo cromatográfico.

Determinación de Fenilefrina, Clorfeniramina y productos de degradación de la Fenilefrina

Se tomó una cápsula del producto farmacéutico y se disolvió en un balón de 10 mL con disolución al 30% v/v de metanol. Esta disolución se llevó a ultrasonido durante quince (15) minutos y luego se filtró para la remoción del sólido suspendido en disolución. La disolución remanente se inyectó directamente en el cromatografo para la determinación de fenilefrina, clorfeniramina y los productos de degradación de la fenilefrina.

5. Resultados Experimentales

5.1 Selección del Modificador Orgánico

Por las razones expuestas a principios de la sección anterior, se comienza con el uso de metanol como solvente orgánico. Mientras que el uso de una solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio se debe su compatibilidad para la posible adaptación del método cromatográfico a la técnica de espectrometría de masas ^[28].

5.1.1 Metanol/Solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio 10mM

En la literatura se han reportado métodos cromatográficos para la determinación simultánea de acetaminofén y fenilefrina a pH ácido ^[29]. Sin embargo, estos requieren del uso de un par iónico para aumentar el tiempo de retención de la fenilefrina. No obstante, éstos generan problemas inherentes a su uso en la técnica de HPLC ^[30]. Por esta razón, en este trabajo se plantea el estudio cromatográfico de los analitos a pH neutro y básico, lo que evita el uso de pares iónicos.

El estudio cromatográfico se inició a pH 7,35. Para ello, se emplearon diferentes concentraciones de solvente orgánico. En la figura 22 se muestran los cromatogramas obtenidos. Como se observa en la figura, los picos cromatográficos a porcentaje de modificador orgánico de 5, 10 y 15% muestran poca definición. Este problema podría atribuirse a la cercanía entre el pH de la fase móvil con el pKa de los analitos, esto hace que el analito se encuentre dentro de la columna cromatográfica en su forma ionizada y neutra, lo cual se refleja en un pico cromatográfico desdoblado y con un factor de asimetría inaceptable en el cromatograma ^[31].

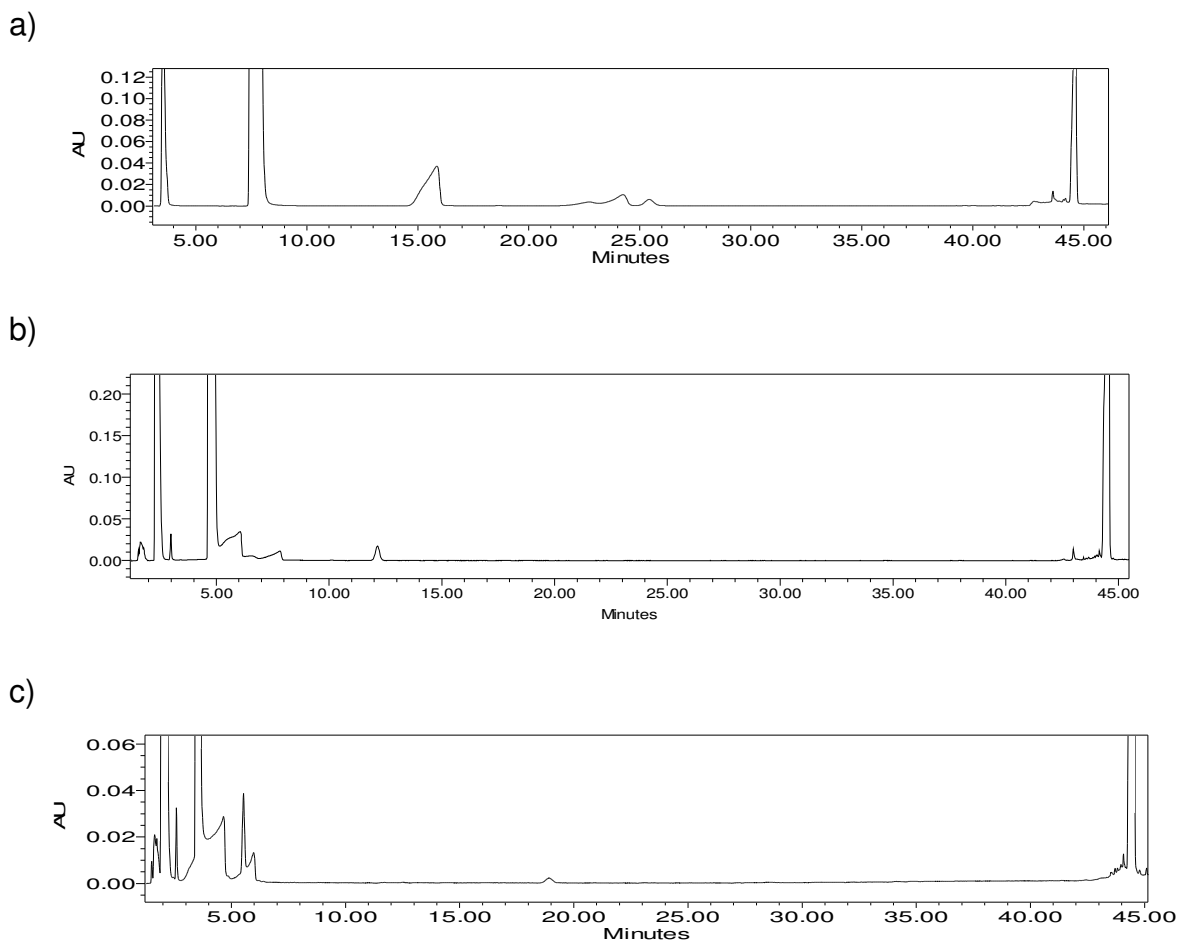


Figura 22. Cromatogramas para acetaminofen, fenilefrina, clorfeniramina y sus productos de degradación obtenidos a diferentes porcentajes de metanol/amoniaco-formiato de amonio (10 mM) pH 7,35 a un flujo de fase móvil de 1 mL min⁻¹: a) 5%, b) 10%, c) 15%

Por otro lado, la clorfeniramina es un compuesto orgánico con un número relativamente alto de átomos de carbono (figura 23), es por ello que fue necesario emplear un mayor porcentaje de solvente orgánico para obtener su elución cromatográfica.

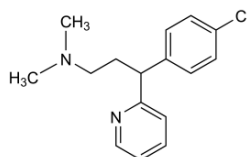


Figura 23. Estructura Molecular de la Clorofeniramina

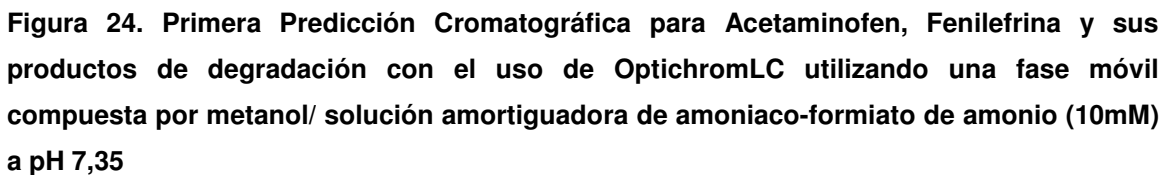
En la tabla 6, se muestran los tiempos de retención obtenidos para cada analito a las diferentes concentraciones de solvente orgánico.

Los valores que se presentan en la tabla 6 fueron utilizados para alimentar el software de modelado cromatográfico, el cual además de toda la información que se mencionó en la sección previa (4.3.4), toma en cuenta el porcentaje de solvente orgánico (fuerza de fase móvil), la longitud de la columna y el flujo de fase móvil como parámetros variantes (software de parámetros multivariantes) para la optimización del tiempo de la corrida cromatográfica. Seguidamente, el software resuelve la función matemática para determinar la mejor solución, en base al algoritmo generalizado de gradiente reducido ^[21].

Tabla 6. Tiempos de Retención obtenidos a diferentes porcentajes de metanol (B) /amoniac-formiato de amonio (10 mM) pH 7,35 y un flujo de fase móvil de 1 mL min⁻¹

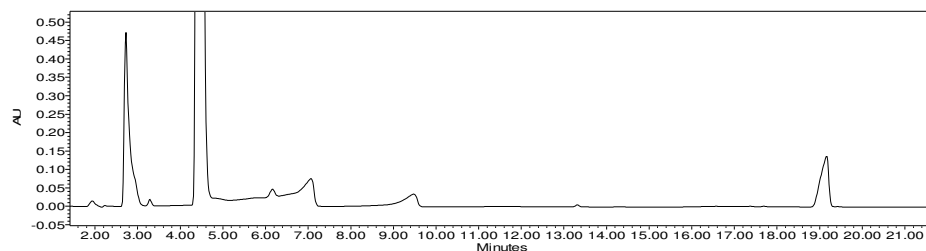
Compuesto	t _R (min) B = 5%	t _R (min) B = 10%	t _R (min) B = 15%	t _R (min) B = 20%
Fenilefrina	3,575	2,323	1,995	1,790
Acetaminofén	7,595	4,696	3,486	2,452
Producto de degradación del APAP	25,542	12,072	5,568	2,851
Producto de degradación del APAP	43,612	42,983	18,967	5,580
Producto de degradación de la Fenilefrina	16,031	2,981	2,593	2,153
Producto de degradación de la Fenilefrina	24,490	7,584	4,481	3,206
Clorfeniramina	23,762 (B = 37%)	14,270 (B = 40%)	6,161 (B = 50%)	

A pesar de que ambas características son alcanzadas con esta primera predicción, el uso de un flujo de fase móvil de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ compromete la vida útil de la columna debido a las altas presiones internas que se generan en la columna cromatográfica. Adicionalmente, un flujo de fase móvil de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ supone un elevado consumo de solventes. Por tal motivo, se realizaron optimizaciones reiterativas con la finalidad de ajustar la mejor solución teórica.



[illegible]

La figura 26 muestra el cromatograma obtenido experimentalmente bajo las condiciones mostradas en la figura 25. A pesar de la predicción cromatográfica, la separación obtenida experimentalmente no coincide con la observada teóricamente. Esto se debe a que el software no estima el factor de asimetría (A_s) al momento de realizar el registro de los datos cromatográficos.

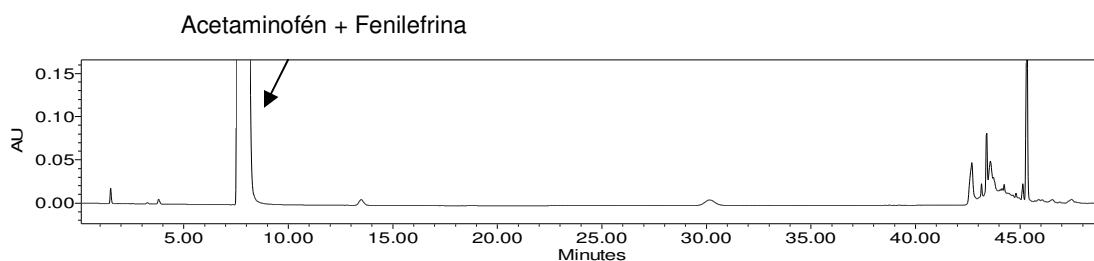


48

Debido a que los resultados obtenidos a pH 7,35 no muestran una resolución cromatográfica adecuada, se estudió el comportamiento de la separación de los componentes a pH 9,38.

Al realizar este estudio, se encontró que la fenilefrina y el acetaminofén coeluyen a porcentaje de solvente orgánico entre 5 y 15%, la figura 27 muestra la comparación cromatográfica entre una inyección de la muestra representativa y una disolución estándar de fenilefrina, donde se observa la elución de la fenilefrina en el mismo tiempo de retención del acetaminofén (alrededor de 9,00 minutos). Por lo tanto, se concluye que a pH básico no hay mejora del comportamiento cromatográfico.

a)



b)

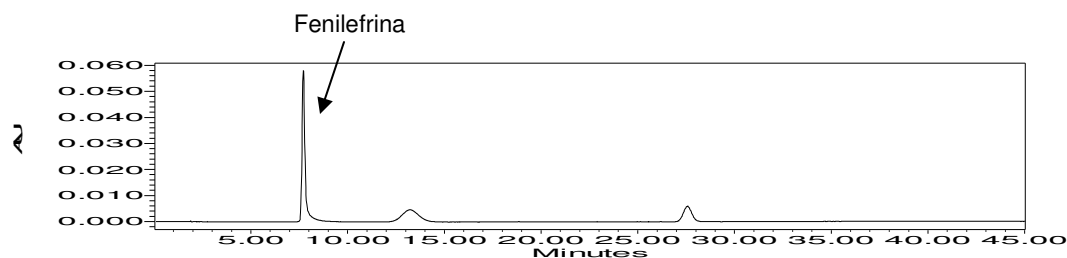


Figura 27. Inyección Cromatográfica utilizando una fase móvil compuesta por metanol/solución de Amoniaco-formiato de amonio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mLmin⁻¹, a) Muestra representativa y b) Solución con los productos de degradacion de la Fenilefrina

En busca de mejorar la resolución cromatográfica, se evaluó el efecto de mayores porcentajes de solvente orgánico. Al realizar esto, se logró la separación de los componentes activos (fenilefrina y acetaminofén) pero desmejora la selectividad de los productos de degradación propuestos. Por esta

razón, la mezcla metanol/amoniaco-formiato de amonio a pH 7,35 y 9,38 fue descartada como fase móvil para la separación de los analitos de interés. En cambio, se utiliza acetonitrilo para observar el comportamiento cromatográfico de los analitos de interés con este solvente orgánico.

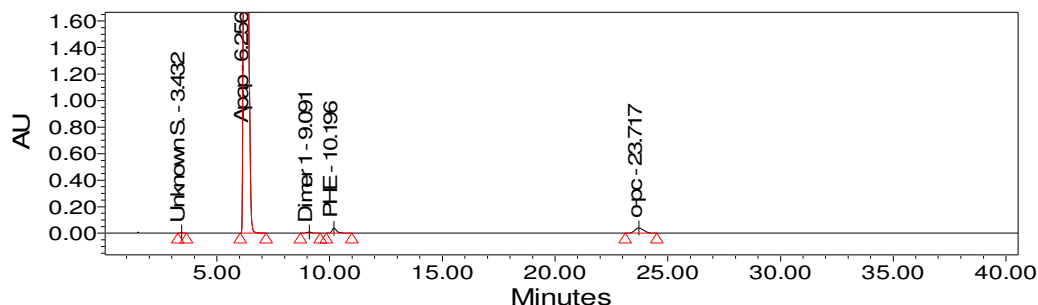
5.1.2 Acetonitrilo/Solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio 10mM

El acetonitrilo representó una opción prometedora por ser un solvente aprótico que ofrece una selectividad diferente a la del metanol, además posee una menor viscosidad y se usa de manera común en la determinación de analitos a bajas longitudes de onda^[19] (180 a 210 nm). Por tal motivo, se inició el estudio cromatográfico basado en los mismos parámetros utilizados con metanol como solvente orgánico, los cuales fueron explicados en la sección anterior.

Al utilizar acetonitrilo/amoniaco-formiato de amonio 10 mM a pH 7,35 como fase móvil, se observó que los picos cromatográficos carecían de la simetría necesaria para la adecuada cuantificación de los analitos, problema similar al observado bajo estas condiciones con el uso de metanol.

A consecuencia de los resultados obtenidos con la fase móvil a pH 7,35, se decidió estudiar el efecto de una fase móvil compuesta por acetonitrilo/amoniaco-formiato de amonio a pH 9,38. Como se puede observar en la figura 28, a pH 9,38 se obtiene una mejor resolución cromatográfica, especialmente a 15% de acetonitrilo/solución de amoniaco-formiato de amonio.

a)



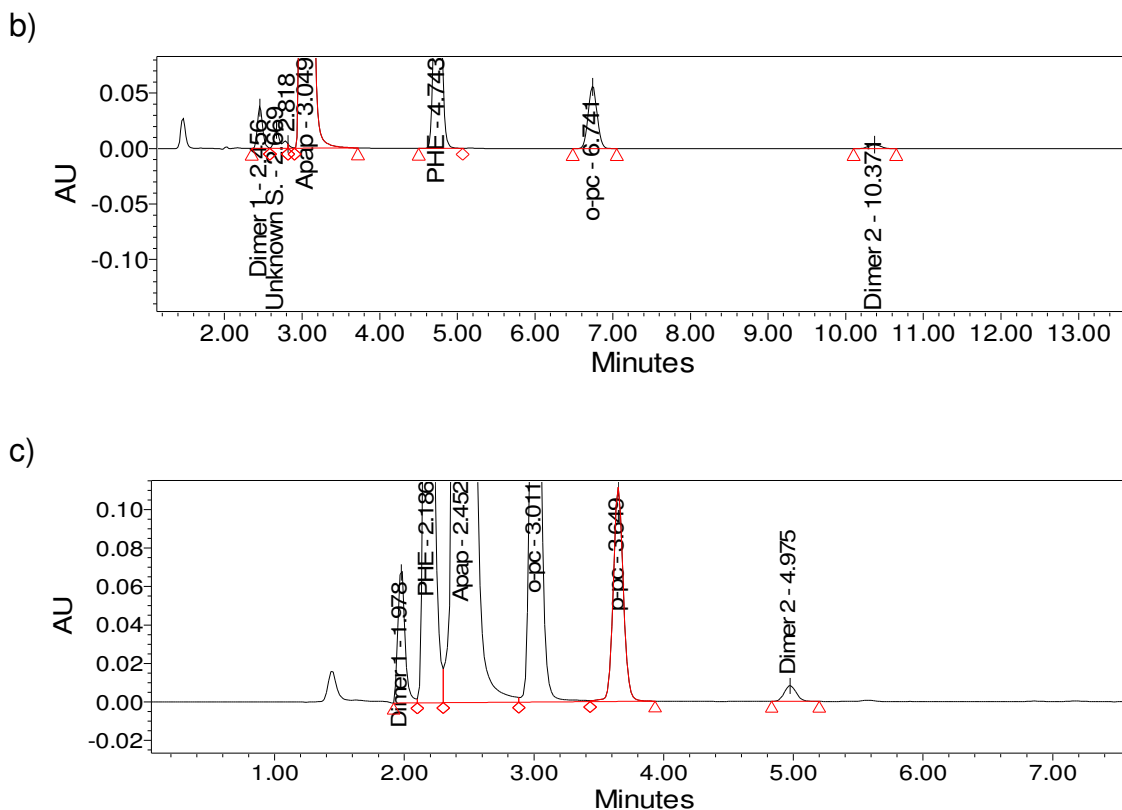
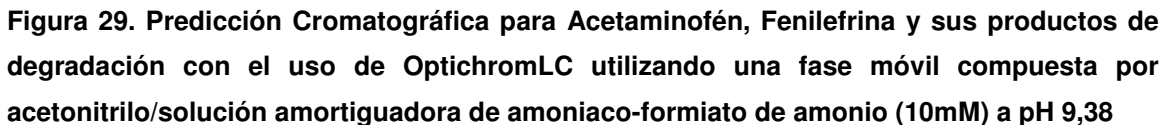


Figura 28. Cromatogramas obtenidos a diferentes porcentajes de acetonitrilo/solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mLmin⁻¹, a) 5%, b) 10% y c) 15%

En la tabla 7 se muestran los tiempos de retención obtenidos para cada analito, según la concentración utilizada de modificador orgánico. En la figura 29 se muestra el resultado de la predicción cromatográfica obtenida luego de realizar una serie de optimizaciones hasta alcanzar una resolución teórica de 2,33 entre el par crítico.

Compuesto	t _R (min) B = 10%	t _R (min) B= 15%	t _R (min) B = 20%
Fenilefrina	2,798	2,201	1,959
Acetaminofén	2,484	1,979	1,707
Producto de Degradación del APAP	2,484	1,979	1,707
Producto de Degradación del APAP	10,404	5,014	3,271
Producto de degradación de la Fenilefrina	4,766	3,032	2,382
Producto de degradación de la Fenilefrina	6,773	3,678	2,502
CPM	36,767 (%B = 25)	3,691 (%B = 50)	2,440 (%B = 65)



52

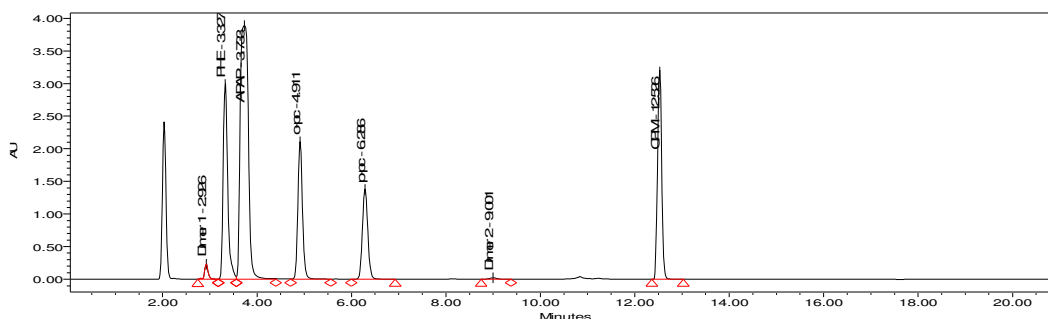


Figura 30. Cromatograma obtenido con el uso de un gradiente de solvente compuesto por acetonitrilo/solución de amoniaco-formiato de amonio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 0,5 mL min⁻¹

Como se observa en la figura 30, existe un ligero solapamiento entre la fenilefrina y el acetaminofén, lo cual resulta en una resolución entre el par crítico menor a dos (2,0). A pesar que la resolución entre el par crítico es aproximadamente 1,5, organismos internacionales como la ICH ^[25] sugieren una resolución mayor o igual a dos (2,0) para el uso de métodos analíticos destinados a la cuantificación de componentes activos y posibles productos de degradación en formulaciones farmacéuticas. Por lo que intentando mejorar este resultado, se realizó otra serie de optimizaciones reiterativas con el software. Sin embargo, no fue posible obtener una mejor resolución cromatográfica.

Debido a esta situación, se empleó una columna de 25 cm de longitud con la finalidad de aumentar la cantidad de platos teóricos y así mejorar la resolución cromatográfica. Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvo la predicción cromatográfica (figura 31). Pero cuando se inyectó la muestra sintética para observar el cromatograma, el resultado no fue satisfactorio (figura 32). Como se puede observar en la figura 32, algunos productos de degradación así como la clorfeniramina muestran una resolución adecuada, pero otros como la fenilefrina y el acetaminofén, no la tienen.

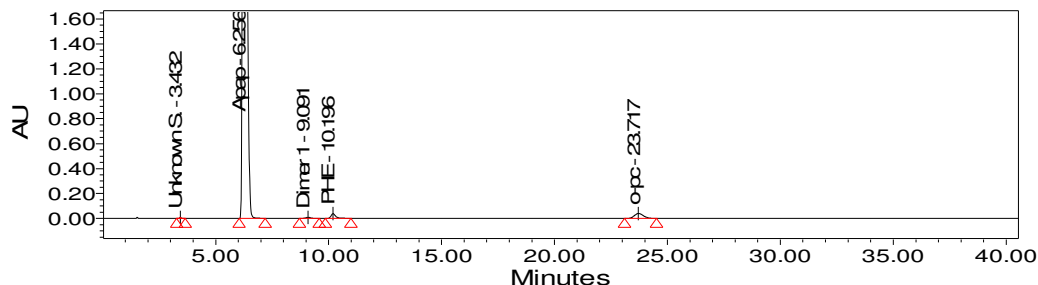
Según los resultados obtenidos, la fase móvil compuesta por acetonitrilo/amoniaco-formiato de amonio no fue satisfactoria, por lo que se continuó evaluando otros tipos de fase móvil que permitiera obtener una mejor resolución de los picos cromatográficos. Para ello, se utilizó una mezcla de metanol/tetraborato de sodio a pH 9,38. A continuación, se presentan los resultados obtenidos con el uso de esta fase móvil.

5.1.3 Metanol/Solución de Tetraborato de Sodio (10mM) a pH 9,38

El tetraborato de sodio se escogió por ser un compuesto salino frecuentemente utilizado para obtener soluciones a pH básico ^[2] las cuales han mostrado mejores resultados sobre la selectividad y resolución cromatográfica que las soluciones a pH neutro. Además, esta sal posee un bajo costo, se encuentra ampliamente disponible en el mercado y no es tóxica. Esta última cualidad hace que el uso de esta especie química no sea dañino para el ambiente ni para el personal de laboratorio.

En la figura 33 se muestran los cromatogramas obtenidos a diferentes porcentajes de solvente orgánico. En estos cromatogramas se puede observar que las bandas cromatográficas poseen una definición adecuada y una resolución aceptable entre los picos cromatográficos.

a)



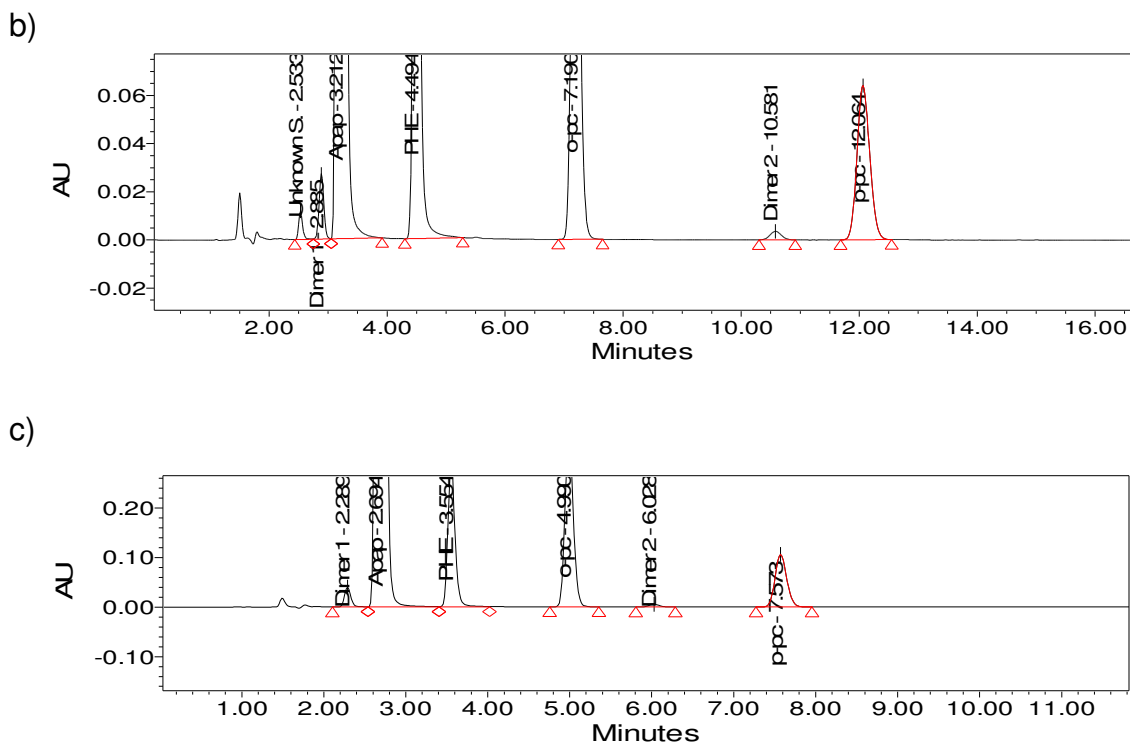


Figura 33. Cromatogramas obtenidos a diferentes concentraciones de metanol/tetraborato de sodio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mL min⁻¹, a) 5%, b) 15% y c) 20%

En la tabla 8 se muestran los tiempos de retención obtenidos a los diferentes porcentajes de solvente orgánico. A partir de estos datos se obtuvo la mejor predicción teórica a través de OptichromLC (figura 34).

Tabla 8. Tiempos de Retención obtenidos con metanol (B)/tetraborato de sodio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mL min⁻¹

Compuesto	t_R (min) B = 5%	t_R (min) B= 10%	t_R (min) B = 15%	t_R (min) B = 20%
Fenilefrina	10,244	6,188	4,507	3,564
Acetaminofén	6,294	4,153	3.221	2,700
Producto de Degradación del APAP	9,200	4,153	2,903	2,297
Producto de Degradación del APAP	NA	22,641	10,628	6,056
Producto de degradación de la Fenilefrina	23,807	11,691	7,215	5,007
Producto de degradación de la Fenilefrina	NA	21,682	12,095	6,056
Clorfeniramina	26,080 (B = 50%)	9,254 (B = 60%)	2,763 (B = 80%)	



Figura 34. Predicción Cromatográfica para Acetaminofén, Fenilefrina y sus productos de degradación utilizando una fase móvil compuesta por metanol/tetraborato de sodio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mLmin⁻¹

Como se puede observar, esta primera predicción fue lo suficientemente prometedora como para verificar el desempeño experimental.

Por tal motivo, se inyectó una muestra sintética para observar experimentalmente la separación cromatográfica (figura 35).

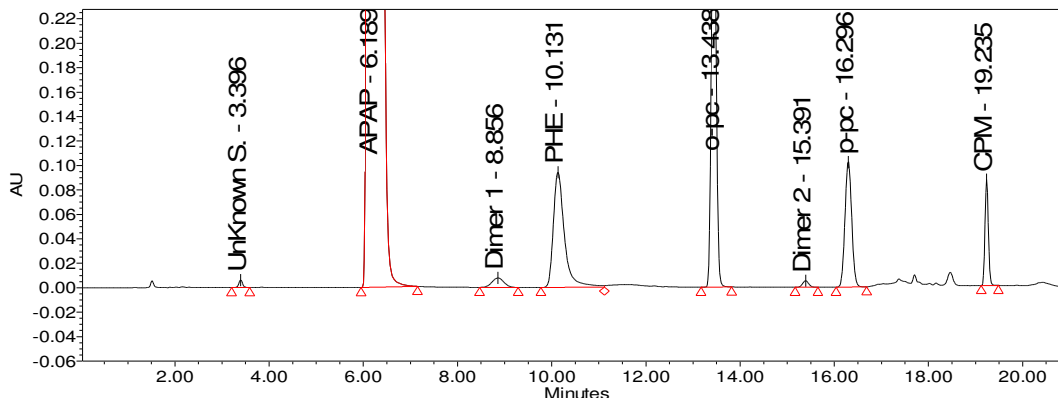


Figura 35. Cromatograma obtenido con el uso de un gradiente de solvente compuesto por metanol/tetraborato de sodio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mL min⁻¹

Según el cromatograma mostrado en la figura 35, con las condiciones experimentales mostradas en la figura 34, se logró obtener la separación cromatografica de siete (7) compuestos, tres componentes activos y cuatro productos de degradación. Además de una especificidad, resolución y tiempo de elución adecuado para el uso de este método analítico en procesos rutinarios llevados a cabo en la industria farmacéutica. Por otra parte, en la figura 35 se encuentra un compuesto desconocido, el cual no había sido separado anteriormente con la metodología utilizada. Dicho compuesto fue señalado en el cromatograma como “Unknown S”.

Para verificar la presencia de este compuesto se inyectaron, por separado, las soluciones con los productos de degradación del acetaminofén y la fenilefrina, obteniéndose la aparición del pico correspondiente al compuesto desconocido en la disolución de los productos de degradación del acetaminofén (figura 36). Este resultado indica que posiblemente el acetaminofén puede degradarse en otra sustancia además de los productos de degradación propuestos en este trabajo de investigación. Además, es importante mencionar

que esta sustancia se encuentra bien separada de los demás analitos (figura 35) por lo cual podría ser objetivo de estudio en trabajos posteriores.

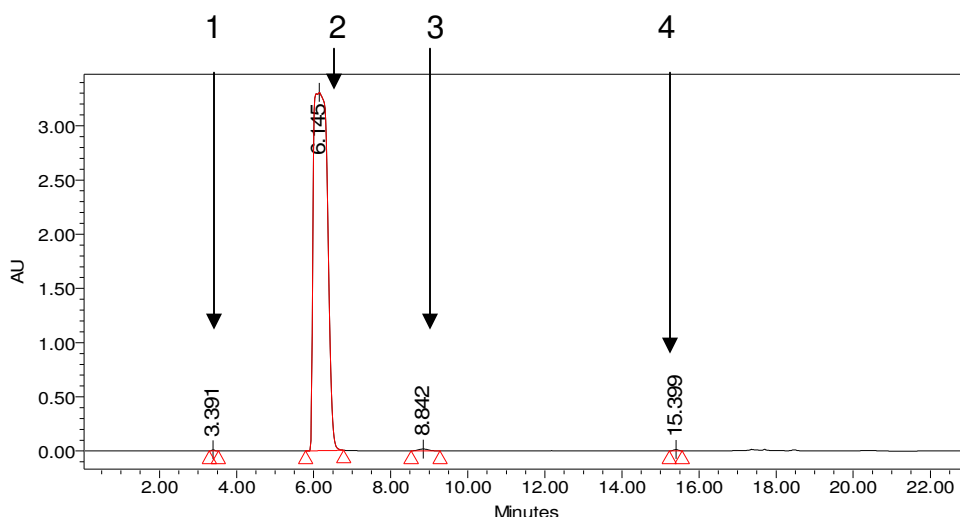


Figura 36. Cromatograma obtenido con el uso de un gradiente de solvente compuesto por metanol/tetraborato de sodio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mL min⁻¹ luego de inyectar la solución con los productos de degradación del acetaminofén, 1) Unknown S., 2) APAP, 3) Dimero 1, 4) Dimero 2

En resumen, con la mezcla metanol/tetraborato de sodio 10 mM a pH 9,38 como fase móvil se obtuvo una separación cromatográfica adecuada. Esto debido a que el tetraborato de sodio 10 mM como fase acuosa, mostró una mejor selectividad que la solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio a pH básico. Posiblemente, esta diferencia en el comportamiento químico entre ambas sustancias, se debe a la capacidad de formación de complejos entre el sistema tetraborato – eluyente, siendo el tetraborato el agente acomplejante.

En la tabla 9 se encuentran resumidas las condiciones optimizadas vía OptichromLC para el análisis cromatográfico de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina, los dimeros del acetaminofén, o-pc y p-pc.

Tabla 9. Condiciones Cromatográficas Optimizadas via OptichromLC

Instrumentación del Método	Tiempo de Gradiente (min)	%A	%B
XBridge C18 Column 3.5 μ m, 4.6x150mm	0	95	5
Flujo de Fase Móvil: 1 mL min ⁻¹	8,5	95	5
Temperatura de la Columna: 40 °C	9,5	80	20
Detección UV: 273 nm	14,5	80	20
Volumen de Inyección: 10 μ m	15,5	20	80
Tetraborato de Sodio 10mM (A)	18	20	80
Metanol (B)	19	95	5
Tiempo de Elución: 25 min	25	95	5

5.2 Figuras de Mérito

Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas, se determinaron las figuras de mérito. En la tabla 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 10. Figuras de mérito para los componentes activos

Figuras de Mérito		Acetaminofén	Fenilefrina	Clorfeniramina
Linealidad (r^2)		0,997	0,994	0,992
Intervalo lineal de respuesta (mg/mL)		(0,03 – 4,00)	(0,003 – 10,000)	(0,003 – 10,000)
Precisión (CV)		0,09	0,21	1,67
Exactitud (% de Recuperación)	Niveles			
	80%	98,50	98,70	99,80
	100%	99,30	99,40	99,30
	120%	98,40	101,10	100,80
LOQ (μ g/mL)		0,40	2,00	5,00
LOD (μ g/mL)		0,10	0,70	2,00

Tabla 11. Figuras de Mérito para los productos de degradación

Figuras de Mérito		Dimero 1	Dimero 2	o-pc	p-pc
Linealidad (r^2)		0,998	0,998	0,999	0,997
Intervalo lineal de respuesta		N/A	N/A	N/A	N/A
Precisión (CV)		3,51	2,34	0,83	2,52
Exactitud (% de Recuperación)	Niveles				
	80%	102,10	97,90	96,90	97,90
	100%	102,50	92,10	96,70	99,20
	120%	102,80	94,50	97,90	100,70
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)		1,00	0,30	2,00	0,90
LOD ($\mu\text{g/mL}$)		0,30	0,10	0,80	0,30

En las figuras 37 y 38 se muestran algunas de las curvas de linealidad obtenidas:

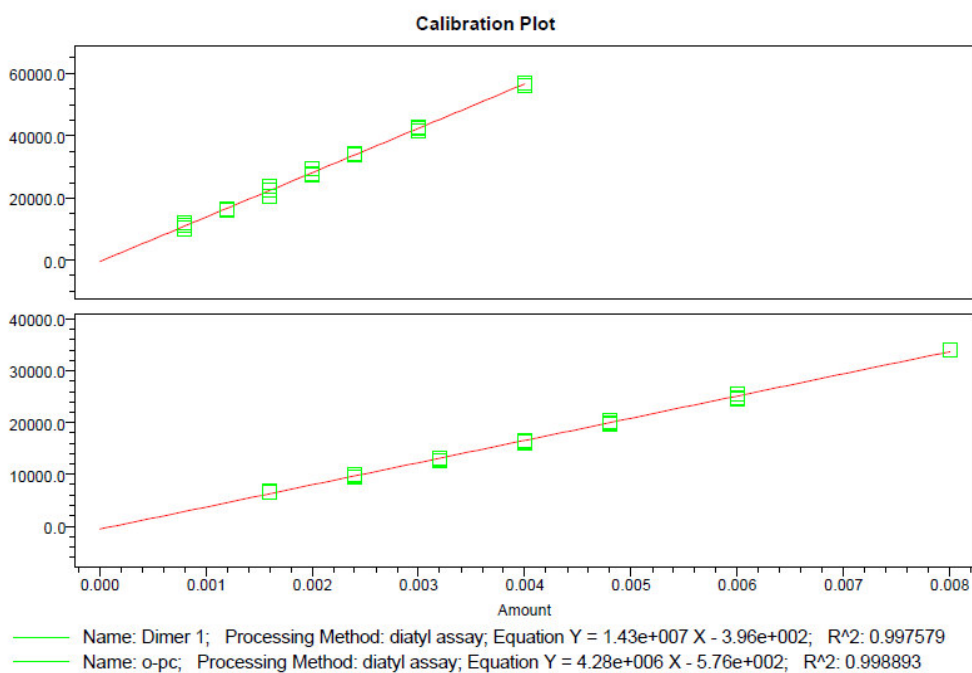


Figura 37. Curva de Linealidad para el Dimero 1 y el o-pc

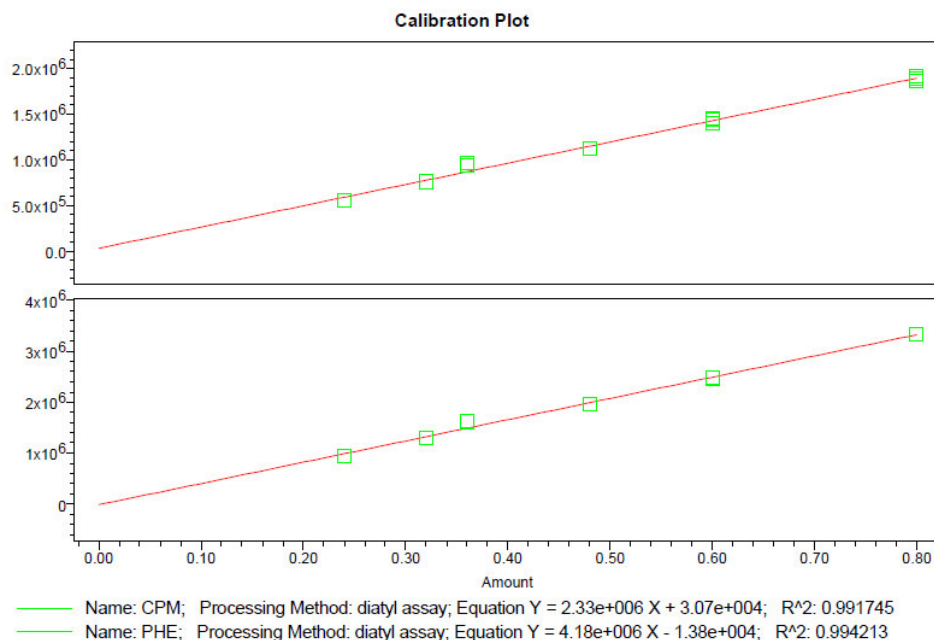


Figura 38. Curva de linealidad para la Fenilefrina (PHE) y la Clorfeniramina (CPM)

Además de evaluar el coeficiente de determinación, también se evaluó el gráfico de residuales para cada analito en el intervalo de linealidad estudiado. Las figuras 39, 41 y 42 muestran algunos de los gráficos de residuales obtenidos. En general, existe una distribución simétrica alrededor de cero, confirmando que existe una correlación lineal entre las áreas cromatográficas obtenidas y la concentración del analito. Sin embargo, es interesante observar el gráfico de residuales para el acetaminofén a concentraciones ubicadas en el intervalo de trabajo (1,200 a 4,000 mg/mL). Para estas concentraciones se puede observar un gráfico de residuales que comienza con valores negativos, alcanza un máximo valor positivo y luego vuelve a valores negativos. Esto sugiere que para estos valores, la relación lineal entre el área y la concentración comienza a perderse aunque no lo suficiente para obtener un coeficiente de determinación menor a 0,990 como se muestra la tabla 10. Para confirmar esta observación, se inyectó disoluciones estándar de acetaminofén a

concentraciones mayores a las estudiadas en el intervalo de trabajo, obteniendo una curva de linealidad con un coeficiente de determinación menor a 0,990 (figura 40), esto concuerda con el gráfico de residuales mostrado en la figura 39 (parte c) donde se observa que los valores son cada vez más positivos, sugiriendo que se debería representar una curva diferente ^[32]. A su vez, este fenómeno también se puede explicar como una consecuencia de la ley de Beer ^[33], la cual describe en forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas. A concentraciones altas, la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas ^[33]. Esta interacción puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Debido a que la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración ^[33]. No obstante, este problema puede solucionarse mediante dilución del medio que contiene al analito ^[33], es por ello que en la figura 39 (parte “a” y “c”) se observan gráficos de residuales más simétricos alrededor de cero y además se obtienen coeficientes de determinación mayores a 0,990 para ambas escalas de concentraciones, las cuales se encuentran en el intervalo de trabajo y por debajo del intervalo de trabajo.

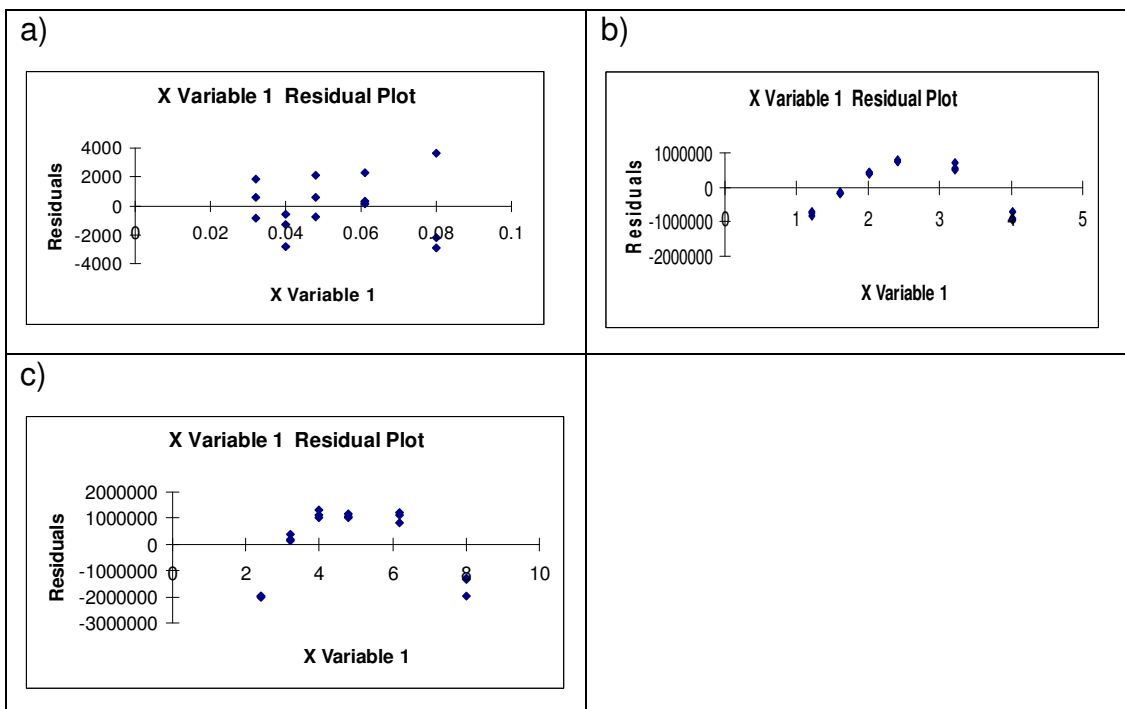


Figura 39. Gráfico de Residuales para el Acetaminofén: a) Intervalo lineal a concentraciones por debajo del intervalo de trabajo, b) Intervalo de trabajo, c) Intervalo lineal a concentraciones por encima del intervalo de trabajo

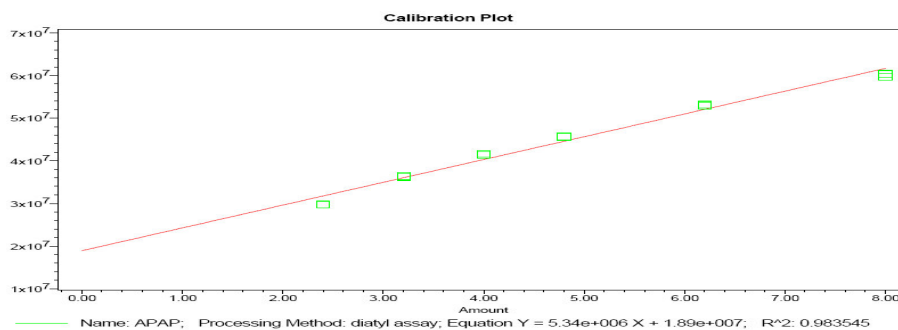
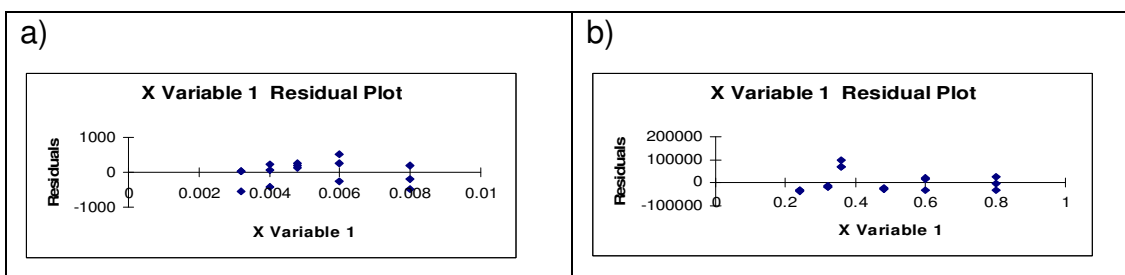


Figura 40. Curva de linealidad para el acetaminofén a concentraciones por encima del intervalo de trabajo ($r^2 = 0,984$)



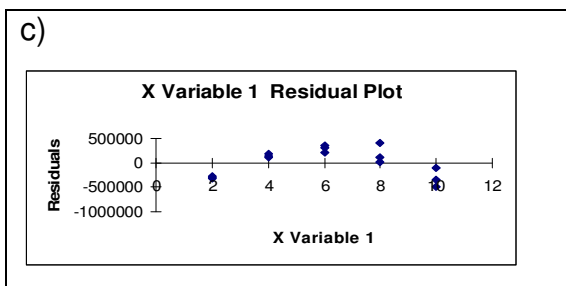


Figura 41. Gráfico de Residuales para la Fenilefrina: a) Intervalo lineal a concentraciones por debajo del intervalo de trabajo, b) Intervalo de trabajo, c) Intervalo lineal a concentraciones por encima del intervalo de trabajo

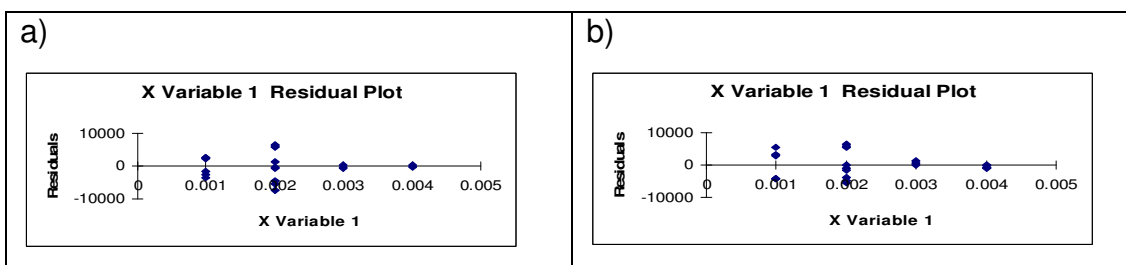


Figura 42. Gráfico de Residuales para a) Dimero 1 y b) Dimero 2 en el intervalo de trabajo

Debido a los argumentos expuestos anteriormente, se recomienda utilizar un intervalo de trabajo entre 1,200 y 2,400 mg/mL para el acetaminofén. En este intervalo de concentraciones se observa una distribución normal de los puntos alrededor de cero (figura 43) y un coeficiente de determinación $r^2 = 0,999$ (figura 44).

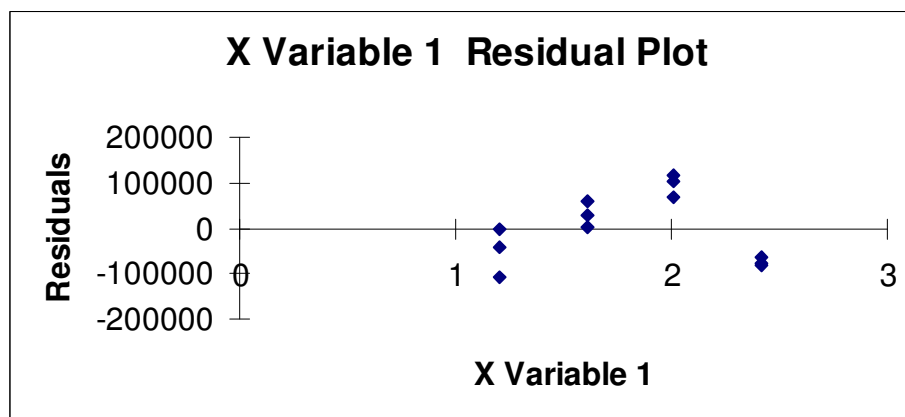


Figura 43. Gráfico de Residuales para concentraciones desde 1,200 hasta 2,400 mg/mL

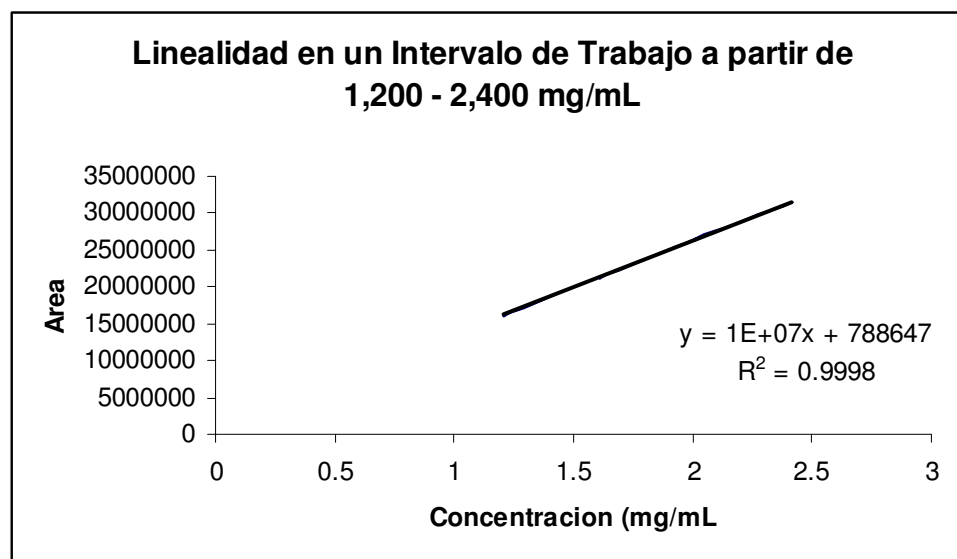


Figura 44. Curva de linealidad para concentraciones desde 1,200 hasta 2,400 mg/mL

Por otro lado, las figuras 45 y 46 muestran los cromatogramas obtenidos del estudio de recuperación para evaluar la exactitud del método:

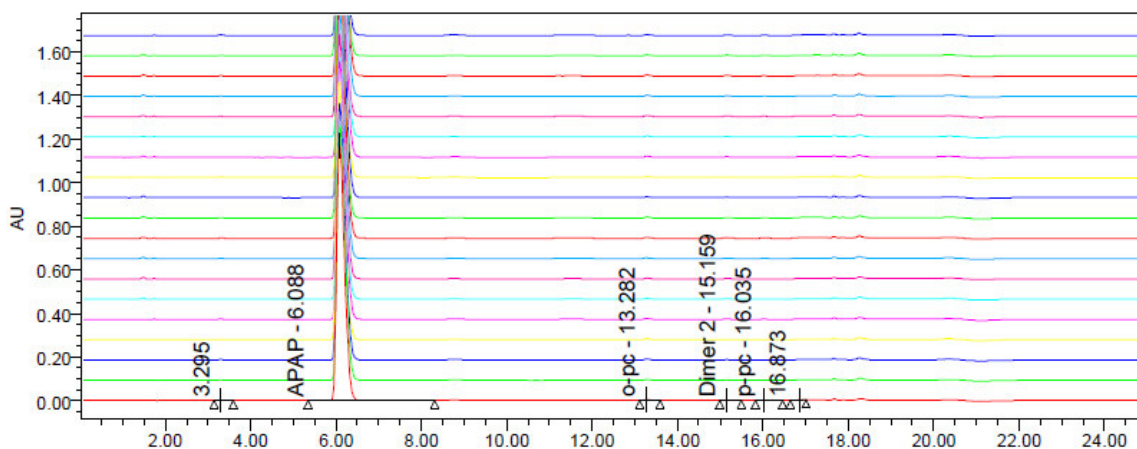


Figura 45. Representación de Cromatogramas superpuestos para el estudio de exactitud del p-pc y el Dimero 2

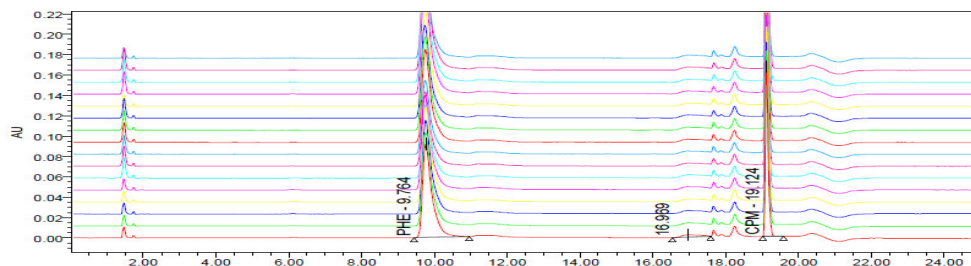


Figura 46. Representación de Cromatogramas superpuestos para el estudio de exactitud de la Fenilefrina (PHE) y la Clorfeniramina (CPM)

En la figura 47 se muestra el cromatograma utilizado en el estudio de la especificidad del método. La tabla 12 muestra la resolución cromatográfica para los dos pares críticos observados en el cromatograma de la figura 47, donde se nota que el factor de resolución es mayor a dos (2,0) y por lo tanto se puede asegurar que el método cromatográfico desarrollado y optimizado mediante OptichromLC posee una adecuada especificidad para la determinación de componentes activos y los productos de degradación propuestos en este trabajo.

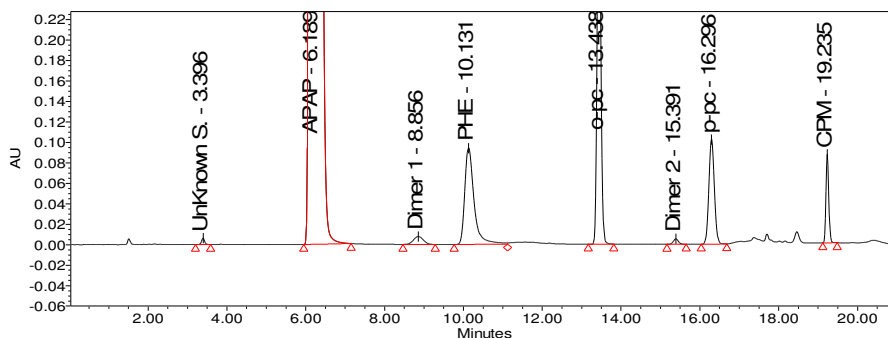


Figura 47. Cromatograma obtenido luego de la inyección de una solución representativa de la muestra

Tabla 12. Factor de Resolución para los pares críticos

Par Critico	Resolución Cromatográfica
Dimero 1 - Fenilefrina	2,64
Dimero 2 – p-pc	3,90

5.3 Aplicación del método cromatográfico en una muestra farmacéutica comercial

Se aplicó el método cromatográfico a una muestra farmacéutica comercial que contiene los analitos de interés en esta investigación. Las figuras 48, 49, 50 y 51 muestran los cromatogramas obtenidos a las concentraciones representativas de los activos (acetaminofén, fenilefrina y Clorfeniramina respectivamente) para el monitoreo de los degradantes de acuerdo a los lineamientos de la ICH ^[25]. Es importante resaltar que el método cromatográfico debe ser capaz de medir la concentración de los productos de degradación correspondiente al 0.05% de la concentración del activo en la preparación de la muestra ^[25].

Como se observa, el método de cromatografía líquida en fase reversa desarrollado y optimizado en este trabajo, es específico para el análisis de acetaminofén, fenilefrina y clorfeniramina en la muestra farmacéutica comercial seleccionada, además se detecta uno de los productos de degradación del acetaminofén (Dimero 1). Por otro lado, no se detectan picos cromatográficos referentes a los productos de degradación de la fenilefrina (figura 50 y 51).

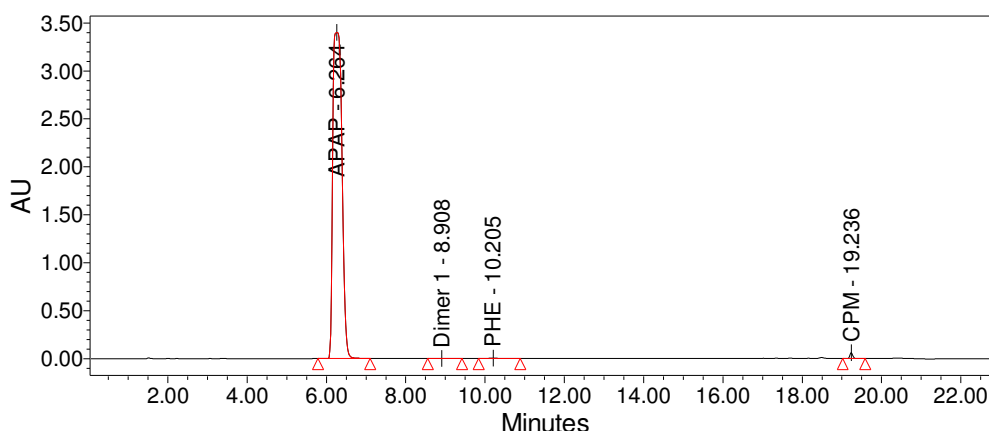


Figura 48. Cromatograma obtenido para el producto farmacéutico seleccionado a la concentración representativa de acetaminofén para el monitoreo de sus productos de degradación (dímeros) de acuerdo a los lineamientos de la ICH ^[25].

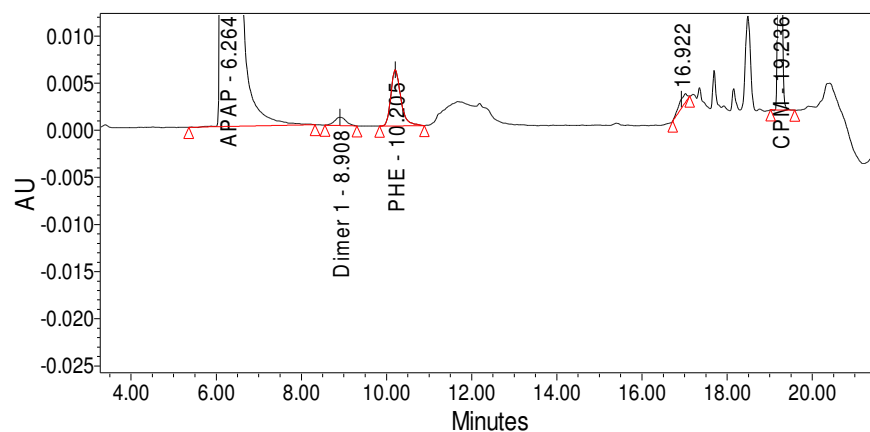


Figura 49. Ampliación del cromatograma anterior

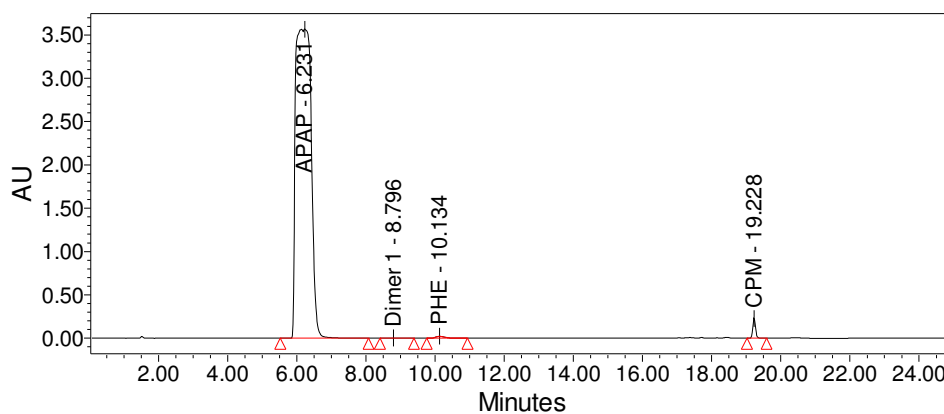


Figura 50. Cromatograma obtenido para el producto farmacéutico seleccionado a la concentración representativa de fenilefrina y clorfeniramina para el monitoreo de los productos de degradación (o-pc y p-pc) de acuerdo a los lineamientos de la ICH ^[25].

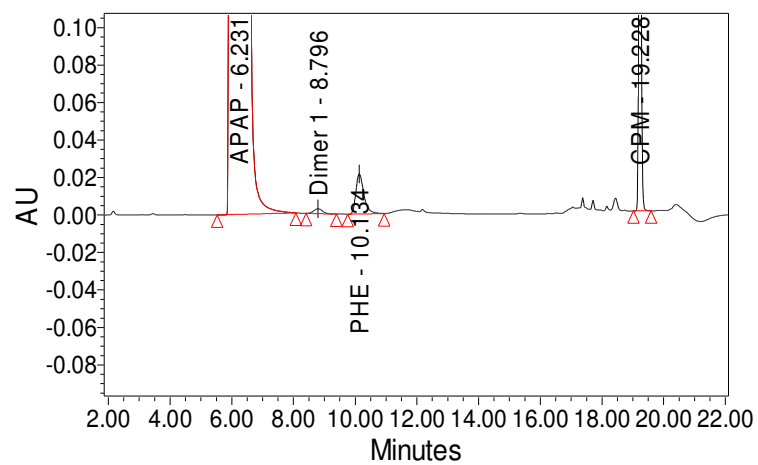


Figura 51. Ampliación del cromatograma anterior.

Conclusiones

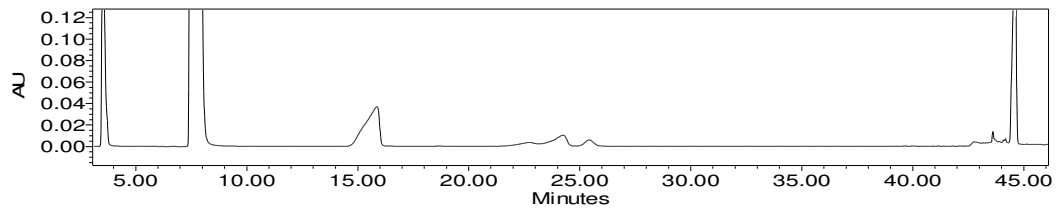
- El sistema metanol/solución de tetraborato de sodio como fase móvil es adecuado para la separación cromatográfica simultánea de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina y los productos de degradación del acetaminofén y la fenilefrina seleccionados en este trabajo.
- OptichromLC es una herramienta matemática que permite modelar y optimizar condiciones cromatográficas en un tiempo menor que el método clásico de ensayo y error, el cual toma desde semanas hasta meses en lograr la optimización de dichas condiciones.
- Las figuras de mérito evaluadas para cada analito, demuestran que el método puede ser empleado para el análisis de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina y productos de degradación (dimeros, o-pc y p-pc).
- La aplicación del método de separación analítica sobre una muestra farmacéutica comercial, demuestra que el método es específico para el análisis de acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina y los productos de degradación propuestos en este trabajo (dimeros, o-pc y p-pc). Por lo cual, este método cromatográfico puede ser empleado en análisis rutinarios de formulas farmacéuticas similares a la empleada en este trabajo.

Recomendaciones

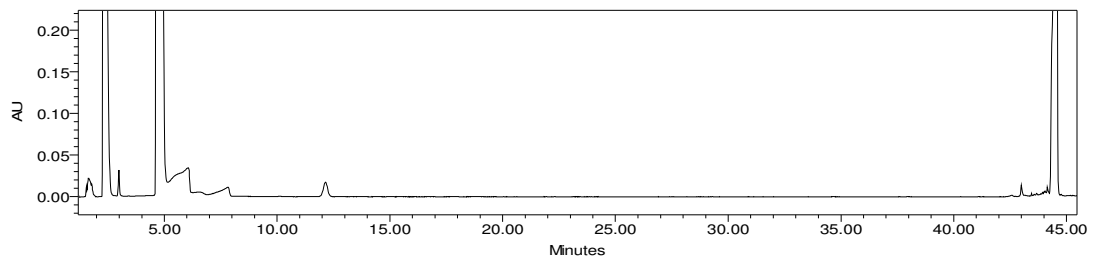
- Estudiar el comportamiento cromatográfico del acetaminofén, fenilefrina, clorfeniramina y los productos de degradación del acetaminofén y la fenilefrina, utilizando una fase móvil compuesta por acetonitrilo/solución de tetraborato de sodio 10mM a pH 9,38.
- Purificar y caracterizar la sustancia desconocida, denominada en este trabajo como “Unknown S.”
- El software no contempla el factor de asimetría (As) de las bandas cromatográficas. Esto genera la existencia de ligeras diferencias entre la predicción teórica a través del software y el cromatograma obtenido experimentalmente. Por lo tanto, es necesario que el analista tome en cuenta este factor para discernir cuales condiciones cromatográficas le serán mas útiles.

Anexo

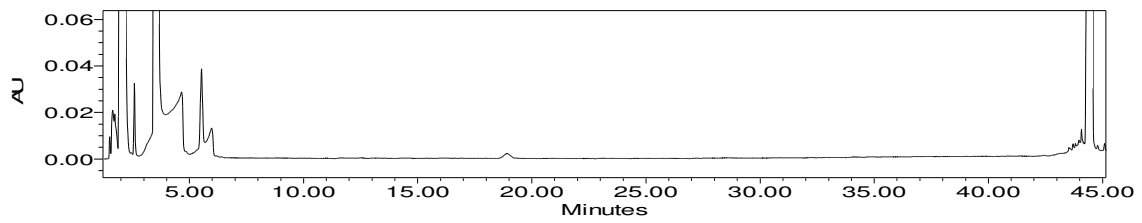
a)



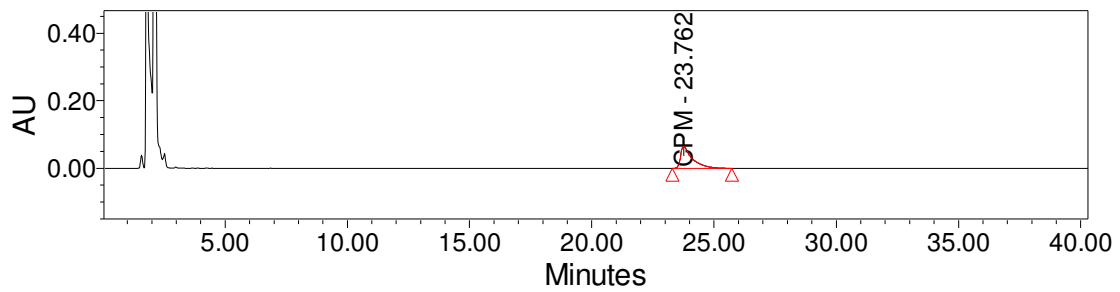
b)



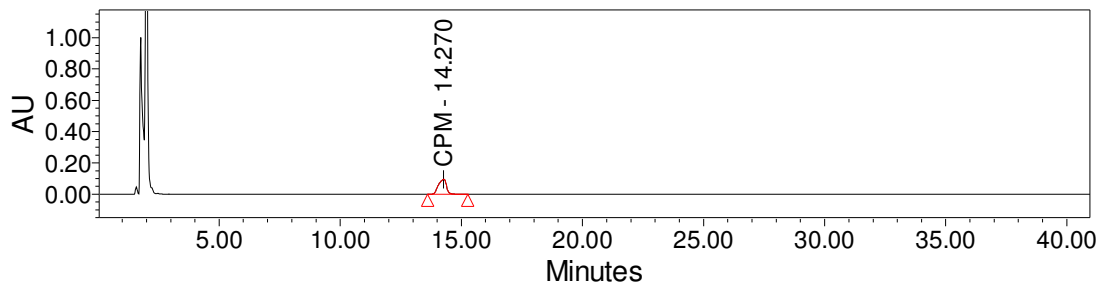
c)



d)



e)



f)

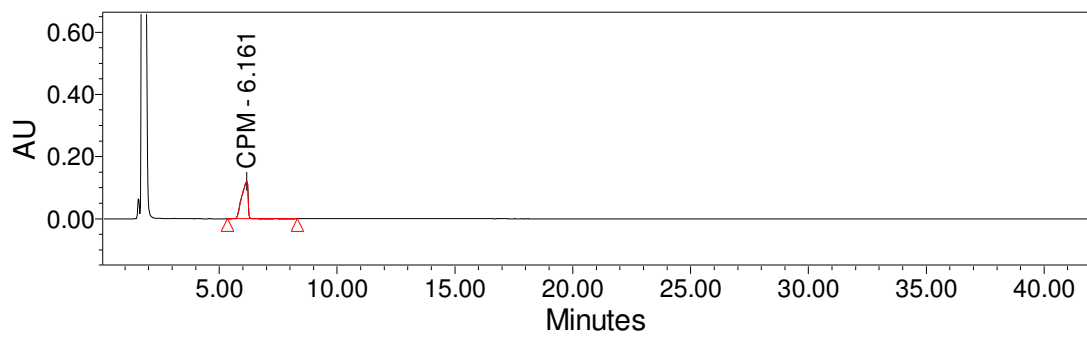
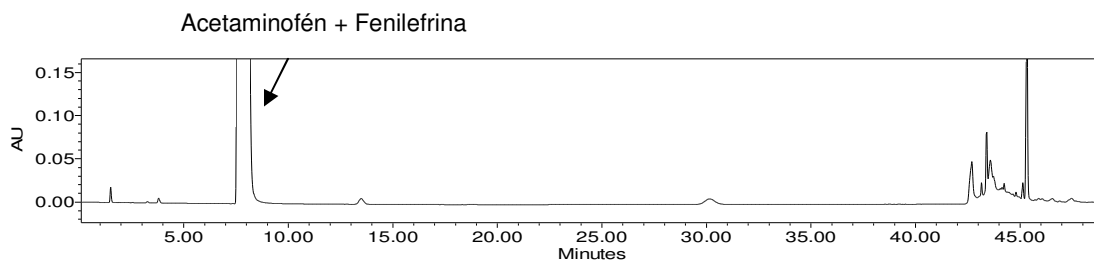


Gráfico 1. Cromatogramas obtenidos con el uso de una fase móvil compuesta por Metanol (B)/Solución Amortiguadora de Amoniac-Formiato de Amonio 10mM a pH 7,35; a) B= 5%, b) B= 10%, c) B= 15%, d) B= 37%, e) B= 40%, f) B= 50%

a)



b)

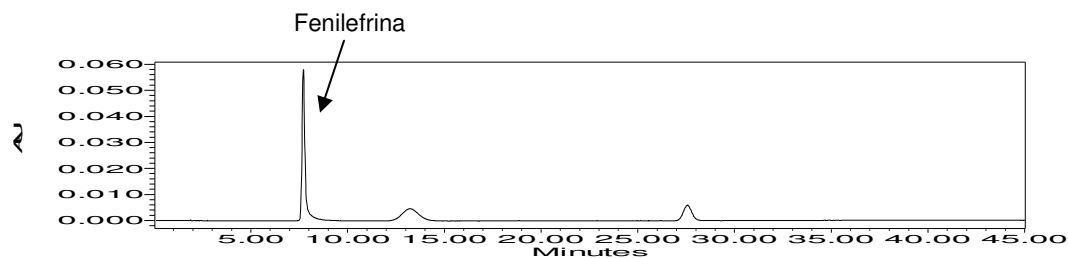


Gráfico 2. Inyección Cromatográfica utilizando una fase móvil compuesta por metanol/solución de Amoniac-formiato de amonio (10mM) a pH 9,38 y un flujo de fase móvil de 1 mLmin⁻¹, a) Muestra representativa y b) Solución con los productos de degradacion de la Fenilefrina

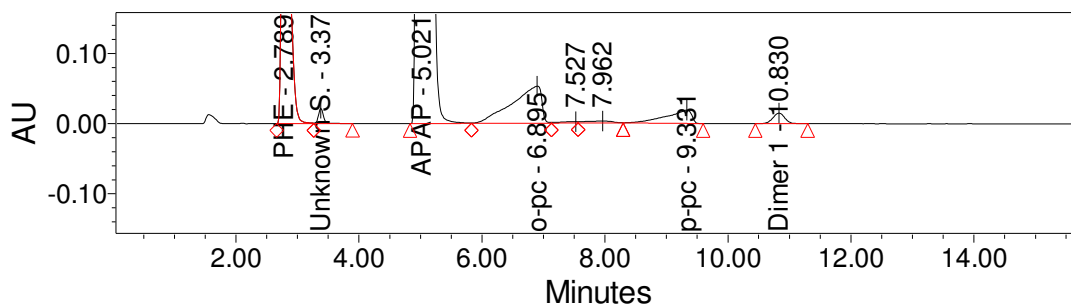
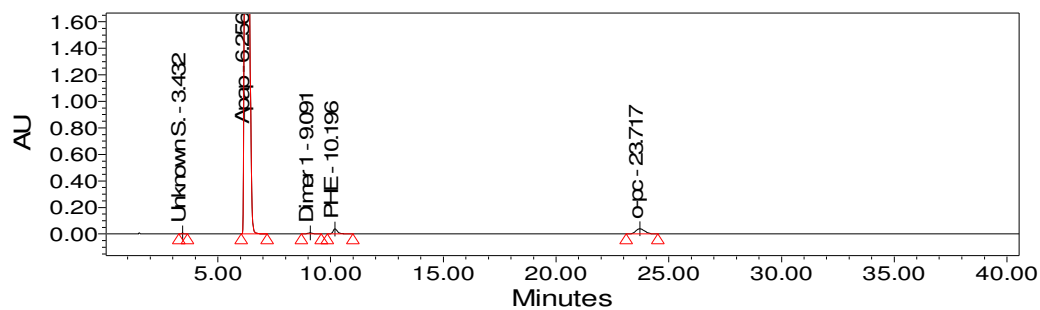
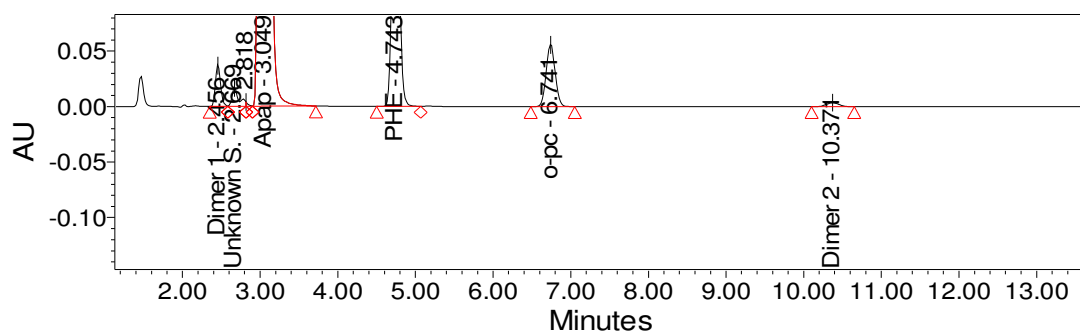


Gráfico 3. Cromatograma obtenido con el uso de una fase móvil compuesta por Acetonitrilo (5%)/Solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio 10mM a pH 7,35

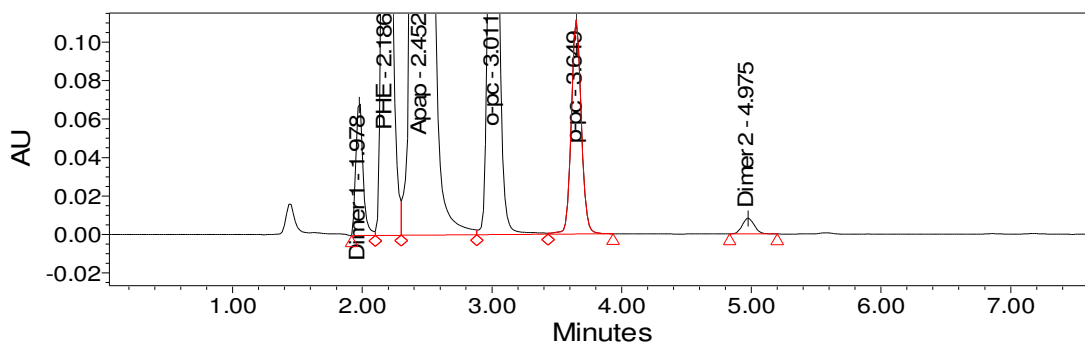
a)



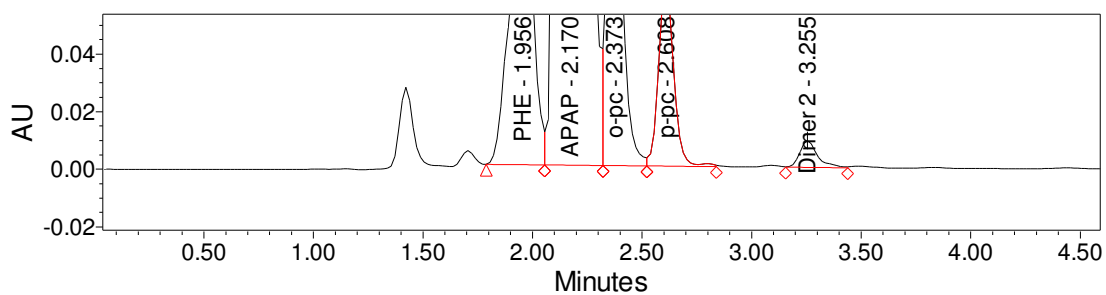
b)



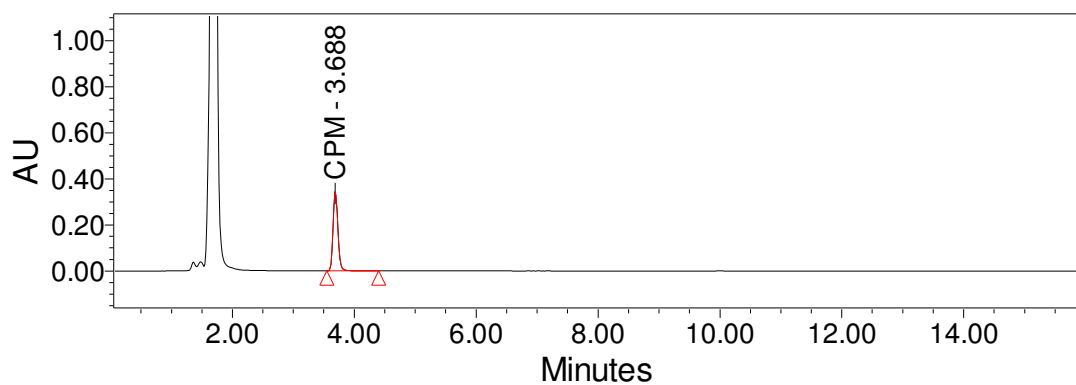
c)



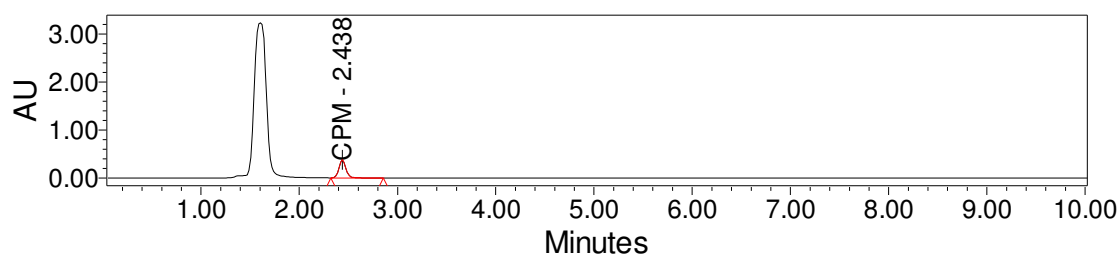
d)



e)



f)



g)

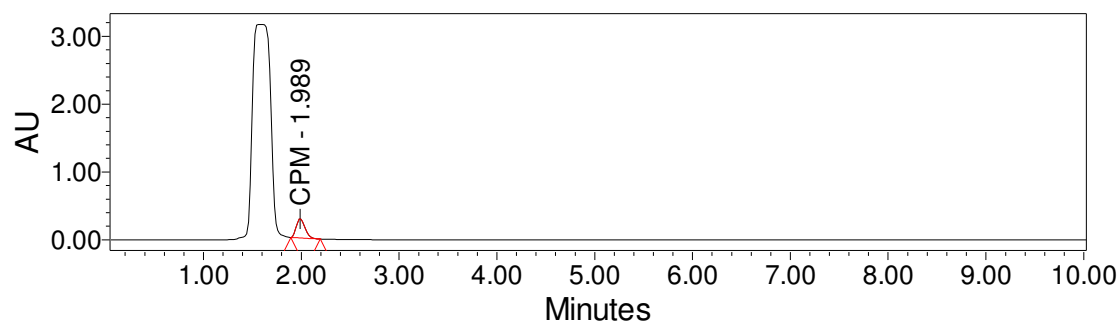
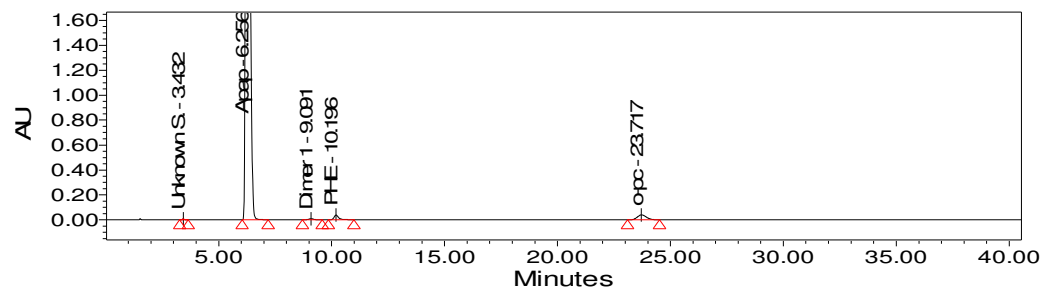
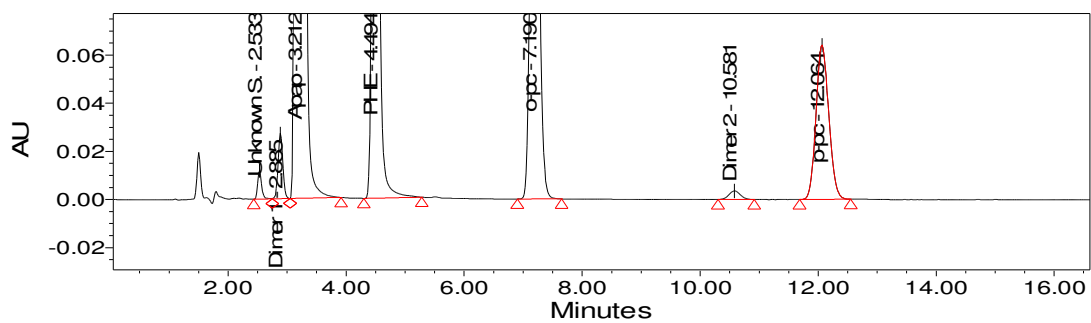


Gráfico 4. Cromatogramas obtenidos con una fase móvil compuesta por acetonitrilo (B)/solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio 10mM a pH 9,38; a) B= 5%, b) B= 10%, c) B= 15%, d) B= 20%, e) B= 25%, f) B= 50%, B= 65%

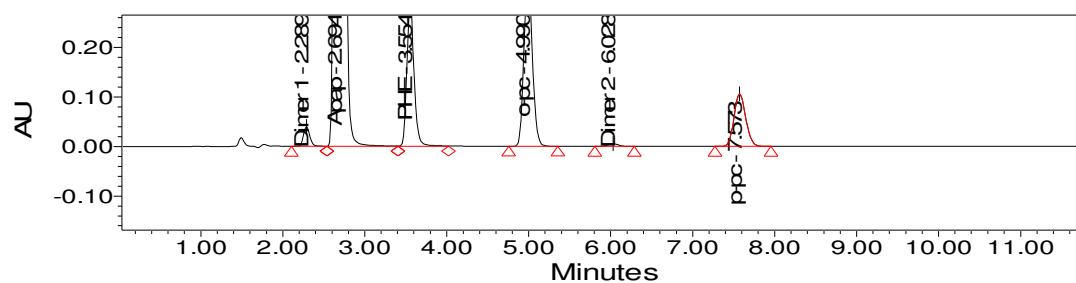
a)



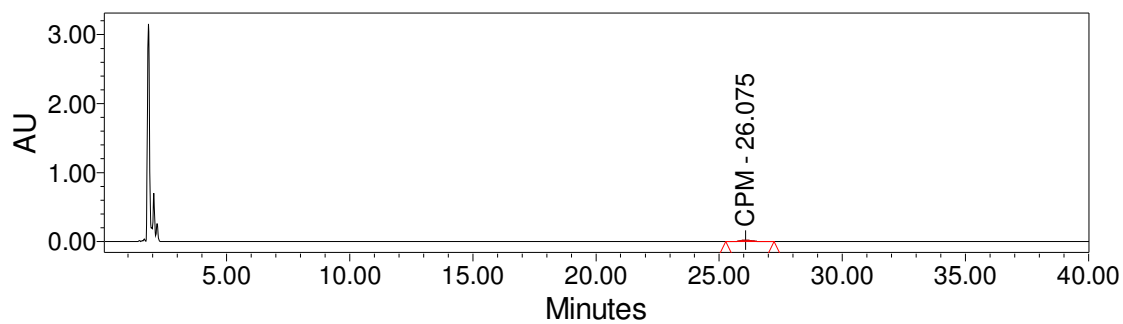
b)



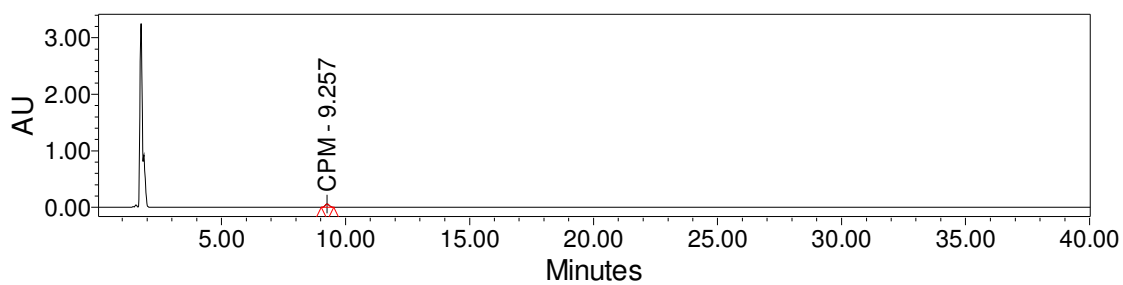
c)



d)



e)



f)

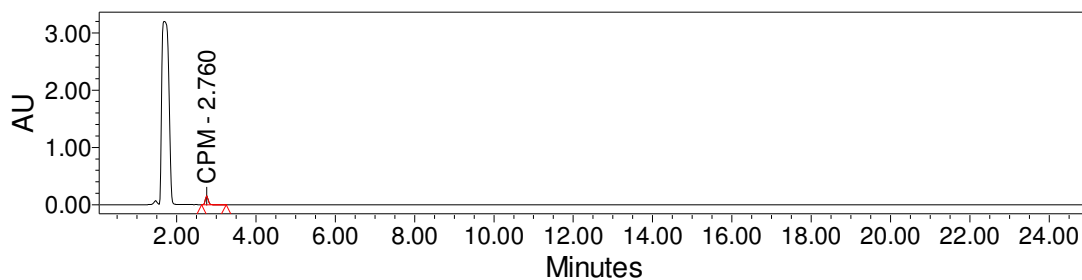


Gráfico 5. Cromatogramas obtenidos con el uso de fase móvil compuesta por metanol (B)/ solución amortiguadora de amoniaco-formiato de amonio 10mM a pH 9,38; a) B= 5%, b) B= 15%, c) B= 20%, d) B= 50%, e) B= 65%, f) B= 80%

Bibliografía

1. M. Espinosa Bosch, A.J. Ruiz Sánchez, F. Sánchez Rojas, C. Bosch Rojas; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42 (2006) 291-321.
2. Internet Explorer 2007, *Enciclopedia Virtual*.
3. Brodie B.B., Axelrod J.; *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 94 (1948) 29-38.
4. Arthur J. Atkinson & Sanford P. Markey; *PRINCIPLES OF CLINICAL PHARMACOLOGY*, Second Edition, Chapter 16.
5. D. Nematollahi, H. Shayani-Jan, M. Alimoradi, S. Niroomand; *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 7407-7415.
6. F. J. Baldwin, A. P. Morley, *Br. J. Anaesth.*, 2002, 88 (3), 440-442.
7. Lotfi Monser, Frida Darghout; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27 (2002) 851-860.
8. D. W. Potter, D. W. Miller and J. A. Hinson; *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 260, No. 22, Issue of October 5 1985, pp. 12174-12180.
9. J. Wong, L. Wiseman, S. Al-Mamoon, T. Cooper, L.-K. Zhang, and T.-M. Chan*; *Major Degradation Products Identified in Several Pharmaceutical Formulations against the Common Cold*, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 7891-7895.
10. H. Trommer, K. Raith, R. H. H. Neubert ; *Investigating The Degradation of The Sympathomimetic Drug Phenylephrine by Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52 (2010) 203-209.
11. Skoog Douglas; *Análisis Instrumental*, 5^{ta} edición, Editorial Mc Graw Hill, Capítulo 28, páginas 785-828.
12. Skoog Douglas; *Análisis Instrumental* , 5^{ta} edición, Editorial Mc Graw Hill, Capítulo 14, páginas 353 – 363.
13. Huheey James, Keiter Ellen & Keiter Richard; *Química Inorgánica*, Cuarta Edición, Editorial Oxford University Press, Capítulo 5, Páginas 162-192.

14. Hun Choi; *Advantages of Photodiode Array*, SCINCO Co. Ltd., Seoul, Korea.
15. A. García, F. J. Rupérez, A. Marín, A. de la Maza, C. Barbas; *Journal of Chromatography B*, 785 (2003) 237-243.
16. B. Olmo, A. García, C. Barbas; *Journal of Chromatography B*, 817 (2005) 159-165.
17. R. Kaliszan, P. Wiczling, M. J. Markuszewski; *Anal. Chem.*, 76 (2004) 749.
18. A. Marín, A. Espada, P. Vidal, C. Barbas; *Anal. Chem.*, 2005, 77, 471-477.
19. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch; *Practical HPLC Method Development*, Ed. John Wiley & Sons, INC, Second Edition, Chapter 6, pages 233 - 248.
20. Derek Lowe; *In the Pipeline*, CORANTE, January 22nd, 2009.
21. Microsoft Support; *Solver Uses Generalized Reduce Gradient Algorithm*, November 16, 2006.
22. Skoog Douglas; *Análisis Instrumental*, 5^{ta} edición, Editorial Mc Graw Hill, Capítulo 26, páginas 730-754.
23. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch; *Practical HPLC Method Development*, Ed. John Wiley & Sons, INC, Second Edition, Chapter 10, pages 439 - 469.
24. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch; *Practical HPLC Method Development*, Ed. John Wiley & Sons, INC, Second Edition, Chapter 10, pages 470 - 476.
25. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use; *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Incorporated on November 2005.
26. M. I. Jimidar, P. Heylen, and M. De Smet; *Method Validation*, HPLC Method Development for Pharmaceuticals, 2007, Chapter 16, pages 441-458.

27. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch; *Practical HPLC Method Development*, Ed. John Wiley & Sons, INC, Second Edition, Chapter 14, pages 645 - 646.
28. Uwe D. Neue; *HPLC Troubleshooting Guide*, Waters Corporation, 2002.
29. Procter and Gamble Industrial, *Apap, PHE, CPM and Dex in Hot Drinks*, 2007.
30. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch; *Practical HPLC Method Development*, Ed. John Wiley & Sons, INC, Second Edition, Chapter 7, pages 337 – 339.
31. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch; *Practical HPLC Method Development*, Ed. John Wiley & Sons, INC, Second Edition, Chapter 5, pages 208 - 223.
32. J.C. Miller and J.N. Miller; *Estadística para Química Analítica*, Segunda Edición, Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, Capítulo 5, 1993.
33. Skoog Douglas; *Análisis Instrumental* , 5^{ta} edición, Editorial Mc Graw Hill, Capítulo 15.