

Desarrollo y validación de un método para cuantificación de acetaminofén en supositorios mediante HPLC-DAD utilizando una variación del método QuEChERS

Arnulfo Rodríguez y Jeffry Martínez ¹
Henry Ponce ²

RESUMEN

Se propone un método para la identificación y cuantificación de acetaminofén en supositorios mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), utilizando una variación del método de extracción QuEChERS. Se empleó la separación cromatográfica utilizada en el método de la farmacopea de los Estados Unidos, edición 35 de 2012, en la que se practica un gradiente isocrático, con una fase móvil compuesta de agua y metanol (70:30). La columna utilizada fue C18 (L1) de 150 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5µm, manteniendo la columna a una temperatura de 45 °C y el detector se colocó a una longitud de onda de 243 nm. Para el proceso de extracción y purificación del analito se utilizó una técnica diferente al que señala la farmacopea, en donde se aplica una extracción líquido-líquido, obteniéndose con el procedimiento desarrollado, elevados valores de recuperación del analito. Los resultados de la validación del método mostraron valores que cumplieron los criterios de aceptación de los parámetros evaluados. El método desarrollado puede ser aplicado para el análisis de acetaminofén en supositorios, con iguales resultados al de la farmacopea, con la ventaja de ser más rápido, menos costoso y amigable con el ambiente.

Palabras claves: *QuEChERS, HPLC, validación, supositorios, farmacopea.*

¹ Estudiantes, Departamento de Control Químico, Facultad de Química y Farmacia, UNAH: aerm092@gmail.com, yefrinahunm@gmail.com

² Asesor, Departamento de Control Químico, Facultad de Química y Farmacia, UNAH: henry.ponce@unah.edu.hn

ABSTRACT

A method for the identification and quantification of acetaminophen suppositories is proposed by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), using a variation of QuEChERS extraction method. Chromatographic separation used in the method of US Pharmacopoeia, 35 edition of 2012, in which an isocratic gradient practiced with a mobile phase composed of water and methanol (70:30) was used. The column used was C18 (L1), 150 x 4.6 mm, with a particle size of 5µm, maintaining the column at a temperature of 45°C, and the detector was placed at a wavelength of 243nm. For the process of extraction and purification of the analyte to a different technique pointing pharmacopoeia it was used, wherein a liquid-liquid extraction, obtained with the procedure developed high values of analyte recovery. The results of method validation process showed values that met the acceptance criteria of the parameters evaluated. The method developed can be applied to the analysis of acetaminophen suppositories, with similar results to the pharmacopoeia, with the advantage of being faster, less expensive and environmentally friendly.

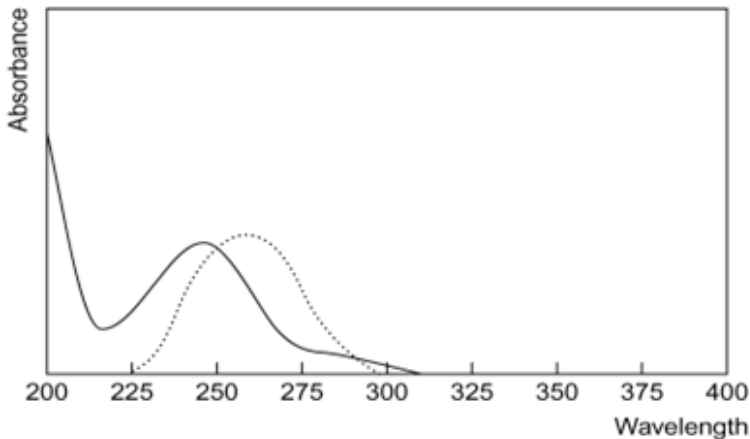
Keywords: *QuEChERS, HPLC, validation, suppositories, pharmacopoeia.*

INTRODUCCIÓN

El fármaco acetaminofén es el metabolito activo de la fenacetina, siendo utilizado en lugar de la aspirina como analgésico-antipirético, con poca actividad antiinflamatoria (Roberts II y Morrow, 2001). En nuestro país es utilizado ampliamente, encontrándose dentro del cuadro básico de medicamentos de los centros asistenciales públicos, administrándose en diferentes formas farmacéuticas.

El acetaminofén es administrado por vía rectal, como supositorio, para tratar muchas condiciones como dolor de cabeza, dolores musculares, artritis, dolor de espalda, dolores de muelas, resfriados, y fiebre. Su efecto antipirético se debe a que puede inhibir la ciclooxigenasa en el encéfalo (Roberts II y Morrow, 2001). El acetaminofén presenta en su estructura química grupos funcionales importantes, dentro de los cuales el carbonilo le brinda la posibilidad de absorber radiación en la región ultravioleta (UV) del espectro electromagnético, con longitudes de onda máximas entre los 240 y 260 nm, como se puede observar en la figura 1.

Figura 1. Estructura molecular y espectro de absorción UV del acetaminofén



Fuente: Moffat, Osselton y Widdop, 2005.

En nuestro país, gran parte de los laboratorios farmacéuticos y de control de calidad de medicamentos utilizan como métodos de análisis los que contemplan los libros oficiales, entre estos los de la farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), que son los más utilizados. En ese sentido, para la valoración del acetaminofén en supositorios, la USP XXXV (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2012) emplea la cromatografía líquida de elevada resolución

(HPLC), con un modo de separación en fase reversa y establece como procedimiento para la preparación de la muestra una extracción líquido-líquido, con treinta mililitros de éter de petróleo, efectuando múltiples lavados con agua destilada.

En este contexto, los métodos por HPLC han demostrado ser la metodología analítica más utilizada para el control de calidad de medicamentos, siendo aplicados con mayor regularidad en nuestro país, sin que esto signifique que sea un método barato y al alcance todos los laboratorios. La cromatografía es una técnica física de separación de compuestos presentes en una mezcla, en la cual los componentes son distribuidos entre dos fases: una estacionaria y una móvil que se mueve en una dirección definida. En el caso de HPLC, la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria puede tener características polares o apolares, pudiendo ser de diversos materiales, tales como sílica, sílica modificada, polímeros, entre otros (Snyder, Kirkland y Dolan, 2010).

Dentro del proceso analítico, una etapa fundamental para alcanzar los resultados deseados, es la preparación de la muestra, puesto que esta debe garantizar la separación, purificación y concentración del o los analitos de interés del resto de los componentes de la matriz. Pese a los grandes avances en la instrumentación analítica, muchas normativas internacionales emplean técnicas de tratamiento de muestra tradicionales dentro de sus procedimientos analíticos, como en el caso de la referida USP XXXV para la valoración de acetaminofén en supositorios, aplicando la extracción líquido-líquido.

Es sabido que esta extracción presenta algunas desventajas importantes, ya que es laboriosa y con elevado consumo de solventes, los cuales en general presentan elevada toxicidad, tanto para el analista, como para el ambiente. Asimismo, en la extracción líquido-líquido no es posible la automatización del procedimiento, sobre todo cuando se cuenta con un elevado número de muestras a analizar (Mitra, 2003). Debido a estos inconvenientes han aparecido novedosas técnicas para el tratamiento de muestras, las cuales buscan convertirse en una técnica ideal de tratamiento de muestras, es decir, rápida, exacta, precisa, que garantice la integridad de la muestra y alto desempeño (Núñez, Gallart, Martins y Lucci, 2012).

Dentro de estas técnicas novedosas, la extracción QuEChERS (por sus siglas en inglés: quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) ha venido ganando popularidad por su simplicidad, rapidez y aplicabilidad. Introducida por Anastassiades y colaboradores (2003), QuEChERS surge como un método de tratamiento de muestras de

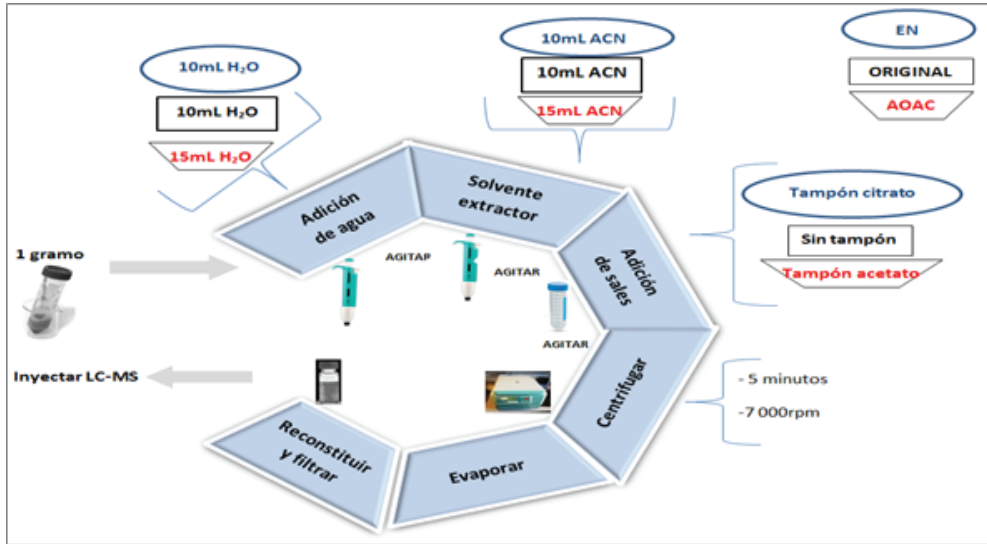
frutas y vegetales en la determinación de multiresiduos de pesticidas, basándose el método original en una extracción a micro escala utilizando acetonitrilo como solvente extractor, la extracción de los analitos contenidos en las muestras con alto contenido acuoso y una partición líquido-líquido utilizando sulfato de magnesio y cloruro de sodio; por último, una etapa opcional de limpieza de extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), utilizando como sorbente amina primaria secundaria (PSA) (Zhang y otros, 2012).

QuEChERS engloba dos etapas principales, comenzando por la etapa de extracción de fase simple, en la que se realiza la adición de un solvente miscible en agua, de carácter hidrófilo, utilizando normalmente acetonitrilo o acetona, a la porción de una muestra homogenizada previamente; esto permite la extracción de los analitos en el solvente. Pese a que ambos solventes son miscibles en agua, pueden separarse fácilmente de la fase acuosa utilizando la adición de una mezcla de sulfato de magnesio anhidro más cloruro de sodio, lo que a su vez promueve la extracción de los analitos en el solvente, por efecto del “salting-out”.

La segunda etapa comprende una d-SPE opcional, que involucra la adición de una cantidad de sorbente en bruto, siendo las más utilizadas la amina primaria secundaria (PSA), carbón negro grafitizado (GCB), octadecilsilano (C18), silicagel, lo mismo que combinaciones de estas, para realizar una limpieza que remueva de forma efectiva muchos de los componentes polares presentes en la matriz, como ácidos orgánicos, lípidos, algunos pigmentos polares y azúcares, que permanecen en el extracto (Anastassiades, 2003). Actualmente existen tres variantes del método QuEChERS, los cuales se diferencian en función de los reactivos utilizados y se presentan a continuación:

1. Método original, introducido en 2003, utiliza cloruro de sodio para mejorar la extracción.
2. Método dispersivo AOAC 2007.01. Se utiliza acetato de sodio como tampón en sustitución del cloruro de sodio.
3. Método europeo EN15662. Similar al método AOAC utilizando cloruro de sodio, citrato de sodio dihidrato y citrato de sodio sequihidrato, en lugar del acetato de sodio. La figura 2 muestra el proceso QuEChERS con sus diferentes variantes.

Figura 2. Esquema de las variantes de QuEChERS



Fuente: Ponce, 2014.

Debido a las enormes ventajas y resultados que pueden obtenerse, la extracción QuEChERS ha sido aplicada en diversos campos de análisis, no solamente para el análisis de pesticidas en alimentos, donde fue originalmente aplicado, sino en el campo de contaminantes ambientales, análisis de alimentos y campo forense para el análisis de drogas de abuso, como se muestra en la tabla 1.

Uno de los aspectos más importante del desarrollo de métodos analíticos es la posterior validación de los mismos, proceso bajo el cual se demuestra, mediante experimentos y cálculos estadísticos, que el método funciona para el objeto que fue creado, en nuestro caso, para la identificación y cuantificación de acetaminofén en supositorios. Para tal fin, existen diferentes recomendaciones de validación de métodos, entre las cuales las más importantes son las de la Comisión Internacional de Armonización (ICH), la cual establece los principales parámetros de desempeño a evaluar, lo mismo que los criterios que deben evaluarse (Guideline, 2006); a nivel regional, el Reglamento Técnico Centroamericano es el organismo que dicta las guías para la validación de métodos analíticos para el análisis y control de medicamentos (RTCA, 2010).

Tabla 1. Resumen de aplicaciones de QuEChERS

Compuestos	Matriz	Campo de aplicación	Método de separación y detección
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	Camarones	Seguridad de alimentos	(RP)LC-MS-MS
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	Peces	Seguridad de alimentos	(RP)LC-fluorescencia
Micotoxinas	Cereales	Seguridad de alimentos	(RP)LC-MSHR
Antihelmínticos (albendazol)	Leche	Seguridad de alimentos	(RP)LC-MS
Acrilamida	Chocolate, patatas fritas, frutas y mantequilla de maní	Seguridad de alimentos	(RP)LC-MS-MS
Antibióticos y drogas veterinarias	Tejido animal	Análisis biológicos	(RP)LC-MS-MS
β agonistas	Suplementos dietéticos (tabletas y cápsulas)	Seguridad de medicamentos	(RP)LC-MSHR
Triometanos, benceno, tolueno, etilbenceno y xileno	Suelo	Análisis ambientales	GC-MS
Clorinados	Suelo	Análisis ambientales	GC-ECD
Benzotriazol, benzotiazol y otros	Lodos de depuradora	Análisis ambientales	(RP)LC-MSHR
Pesticidas organofosforados	Contenido gástrico	Análisis forense	GC-MS
Drogas de abuso	Sangre	Análisis forense	(RP)LC-MS-MS

RP= Fase reversa; LC= Cromatografía líquida; MS= Espectrometría de masas; GC= Cromatografía de gases; ECD=Detector de captura de electrones; HR= Elevada resolución

Fuente: Ponce, 2014.

El método de QuEChERS ha sido aplicado en diversos campos del análisis, pero hasta donde conocen los autores, no se han presentado trabajos de investigación que apliquen esta técnica de tratamiento de muestra para el análisis de medicamentos y precisamente supositorios, como alternativa a la extracción líquido-líquido que recomienda el método de la farmacopea. Es por ello que con el presente trabajo se buscó desarrollar un método alternativo para determinar acetaminofén en supositorios, efectuando una variación al procedimiento de QuEChERS y empleando la separación mediante HPLC-DAD que recomienda la farmacopea. Las ventajas que se buscan con este método es que sea rápido, menos costoso, con elevadas recuperaciones de analito. Posteriormente, se efectuó la validación del método analítico siguiendo la guía de la ICH para la referida forma farmacéutica.

MÉTODO

Diseño

El método de investigación se rige por un diseño aleatorio, ya que no se controlaron las cantidades de acetaminofén en los supositorios, de modo que se trabajó con los supositorios comerciales adquiridos de diferentes establecimientos farmacéuticos. Asimismo, se realizó una revisión bibliográfica sobre el método de análisis para dicho compuesto en la forma farmacéutica de supositorios.

Población y muestra

Lotes de supositorios de acetaminofén de 300 mg fueron proveídos de diferentes farmacias de consumo poblacional. Se utilizó un estándar grado USP obtenido de los laboratorios docentes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras para llevar a cabo todos los experimentos.

Entorno

El estudio se efectuó en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en el laboratorio instrumental, en donde se encuentran el cromatógrafo líquido, baño ultrasónico, agitador mecánico, centrifuga, micropipetas y el resto de equipamiento de laboratorio.

Intervenciones

Para el desarrollo del método se utilizó un baño ultrasónico, marca Fisher y un agitador mecánico de la marca KoolLab, modelo KS-VM-1000, centrifuga marca Clay Adams. La separación cromatográfica se efectuó en un cromatógrafo líquido marca Shimadzu, modelo Prominence, consistiendo en una bomba modelo LC20-AT, un sistema de control CMB-20Alite, un inyector automático SIL-20A, un horno de columna CTO-A20 y un detector SPD-M20A. Se utilizó el software EZ Start para recolectar todos los datos obtenidos durante el proceso de investigación.

En el desarrollo de las condiciones cromatográficas se utilizó una columna Alltima C18 de 150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm , a una temperatura del horno de 45 °C. El volumen de flujo de la fase móvil fue de 1,5mL/min y el volumen de inyección se fijó en 15 μL de las soluciones del estándar y las muestras. El detector de arreglo de diodos se controló a una longitud de onda de 243 nm. La fase móvil empleada consistió en una mezcla de agua-metanol (70:30). Acetonitrilo y metanol calidad HPLC fueron utilizados de la marca J.T. Baker y se adquirieron de la casa comercial Labtech, ubicada en Tegucigalpa, Honduras. Sulfato de magnesio, acetato de sodio, ácido acético glacial y silicagel, todos de la marca Merck, fueron adquiridos del almacén de reactivos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Análisis estadístico

Para analizar todos los datos obtenidos en los experimentos del desarrollo y validación del método propuesto, se utilizaron hojas de cálculo de Microsoft Excel 2010, además del software del instrumento EZ Start versión 7.4. Debido a que en el proceso de validación debe definirse qué será evaluado y cómo, es decir, qué criterios de calidad del método serán examinados y bajo qué criterios será realizada dicha evaluación. Todo ello dependerá de una serie de factores relacionados con las características de la matriz, complejidad del método analítico propuesto, exactitud y precisión con que deban expresarse los resultados y la aplicación que tendrá el método propuesto, entre otros aspectos. Para ello, se siguieron las recomendaciones de la ICH, las cuales aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros y criterios recomendados por la ICH

Parámetro	Criterio
Especificidad	Emplear un test de pureza de pico con un detector de arreglo de diodos (DAD)
Linealidad	a. Evaluación del gráfico de calibración lineal b. Ecuación de la recta c. Coeficientes de correlación (r) ≥ 0.998 y determinación (r^2) ≥ 0.99 d. Análisis de varianza (prueba F)
Rango de trabajo	Obtenido del ítem anterior, donde se cumplan los criterios de exactitud, precisión y linealidad
Exactitud (veracidad)	Porcentaje de recuperación en el ensayo de la cantidad de analito reforzado, porcentaje de recuperación entre 90 % – 110 %
Repetibilidad	Análisis de precisión en corto intervalo de tiempo: mismo día, instrumento y analista, evaluación de RSD (%CV); el criterio será menor 2 % para el %CV
Reproducibilidad intermedia	a. Análisis de precisión en condiciones amplias de variación: días; evaluación de RSD (% CV), el criterio será menor 2 % para el %CV b. Prueba t para la variación entre días

Fuente: Creación propia.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

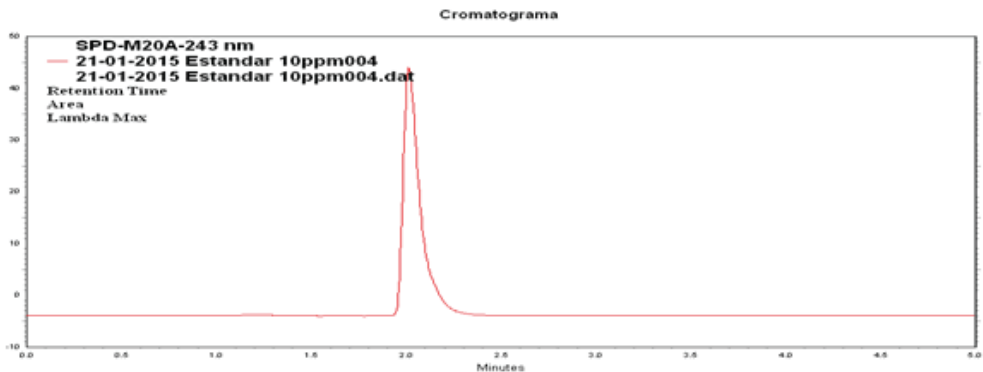
Optimización de la separación cromatográfica

Para la separación cromatográfica se emplearon las condiciones recomendadas por el método de la farmacopea, con las cuales se obtuvo el pico cromatográfico correspondiente al analito poco después de los dos minutos, como se muestra en la figura 3, en donde aparece además del cromatograma de una solución estándar, el espectro de absorción ultravioleta característico del acetaminofén.

Optimización del procedimiento del método QuEChERS

En la optimización de los diferentes parámetros del método QuEChERS se optó por trabajar con algunas condiciones iniciales, efectuando la disolución de la muestra de supositorios, previamente fundidos a baño a maría, en 10 ml de agua destilada, para después agregar 10 ml de dos posibles solventes extractores, acetona y acetonitrilo; asimismo, evaluando el uso de tampón de acetato frente a la extracción sin utilizar regulación de pH.

Figura 3. Cromatograma obtenido con las condiciones finales del método



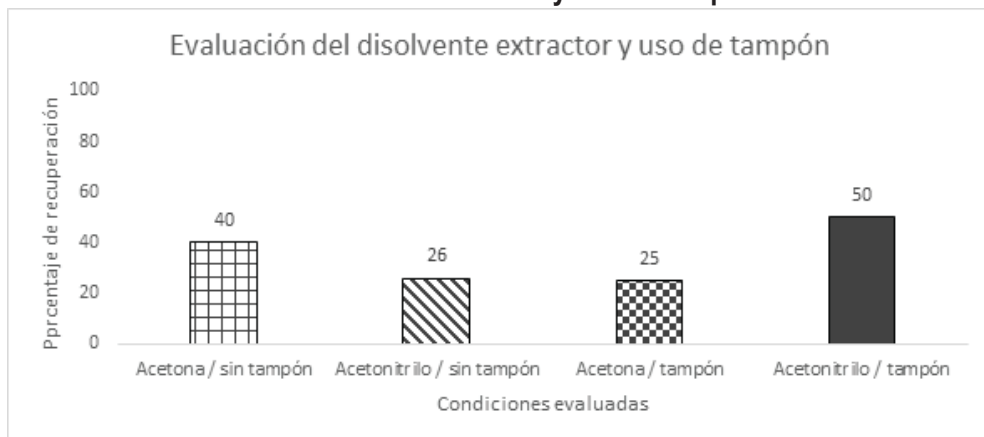
Fuente: Cromatógrafo marca Shimadzu

En el primero de los casos, se observaron mejores resultados en la recuperación del analito cuando se utilizó acetona sin regulación de pH, pero los valores fueron más elevados al combinar la extracción con acetonitrilo y tampón de acetato y ácido acético, con una recuperación cercana al 50 %. Esto puede explicarse debido a que el valor de pKa del acetaminofén es de 9,5 (Moffat, Osselton y Widdop, 2005) y al emplear el tampón de acetato, el cual regula la extracción a un pH cercano a 4,8 estando más alejado del valor donde el analito puede encontrarse ionizado, lo que lo convertiría más a fin a la fase acuosa, disminuyendo de esta forma la recuperación en el acetonitrilo. Los porcentajes encontrados se pueden observar en el gráfico 1.

Luego de realizar diferentes experimentos para incrementar los porcentajes de recuperación, empleando diferentes cantidades de agua y acetonitrilo, lo mismo que variando la temperatura del solvente acuoso, se decidió emplear un solvente apolar, de modo que se pudiera separar el excipiente oleoso presente en el supositorio. La mejor opción a emplear fue el hexano, solvente de baja polaridad, el cual fue capaz

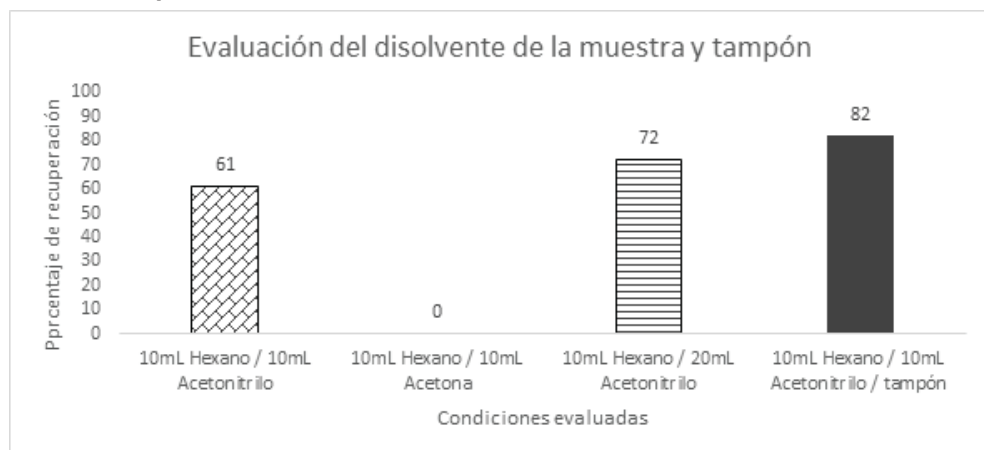
de solubilizar completamente la fase oleosa, dejando liberado el acetaminofén para que este pasará al acetonitrilo. En este punto se repitieron las extracciones con acetona, para evaluar su uso como solvente extractor, pero debido a que presenta miscibilidad en hexano se descartó como solvente extractor. Finalmente, se confirmó el uso de tampón con hexano y acetonitrilo, alcanzando una recuperación mayor al 80 %, resultados mostrados en el gráfico 2.

Gráfico 1. Evaluación del solvente extractor y uso de tampón



Fuente: Creación propia.

Gráfico 2. Optimización del solvente de la muestra



Fuente: Creación propia.

Para finalizar la optimización de la primera etapa de la extracción y en búsqueda de obtener un método más barato, se efectuaron pruebas para disminuir el uso de solventes y sales, lo mismo que el tiempo de centrifugación. Por ello se practicaron cinco extracciones, modificando las condiciones que se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Optimización de primera etapa de QuEChERS

Condiciones evaluadas	Porcentaje recuperado
5 ml de hexano; 10ml de acetonitrilo; 6g MgSO ₄ ; 1,5g CH ₃ COONa	74 %
10ml de hexano; 20ml de acetonitrilo; 6g MgSO ₄ ; 1,5g CH ₃ COONa	68 %
5ml de hexano; 10ml de acetonitrilo; 3g MgSO ₄ ; 0,75g CH ₃ COONa; 5 min centrifugación	87 %
5ml de hexano; 10ml de acetonitrilo; 1,5g MgSO ₄ ; 0,37g CH ₃ COONa; 5 min centrifugación	96 %
10ml de hexano; 10ml de acetonitrilo; 1,5g MgSO ₄ ; 0,37g CH ₃ COONa; 5 min centrifugación	92 %

Fuente: Creación propia.

El valor más alto de recuperación de acetaminofén fue cuando se emplearon 5 mililitros de hexano para solubilizar la muestra, más 10 mililitros de acetonitrilo con ácido acético al 1% y añadiendo 1,5 g de sulfato de magnesio más 0,37 g de acetato de sodio, empleando 5 minutos para centrifugar el extracto. Como puede verse, la variación del doble volumen de hexano no modifica el porcentaje de recuperación, pero al trabajar con menor cantidad de este solvente se vuelve más barato el método, lo mismo que menos producción de desechos químicos. Asimismo, la utilización de una menor cantidad de sales abarata los costos del análisis.

Con respecto a la optimización de la etapa de extracción en fase sólida dispersiva del método, la cual busca una purificación del extracto obtenido, se experimentó únicamente con silicagel como sorbente, ya que solo no se disponía de los otros sorbentes normalmente empleados en QuEChERS. Sin embargo, se realizaron pruebas para optimizar la cantidad a utilizar, lo mismo que el tiempo de centrifugación en esta etapa. Los resultados alcanzados se observan en el gráfico 3.

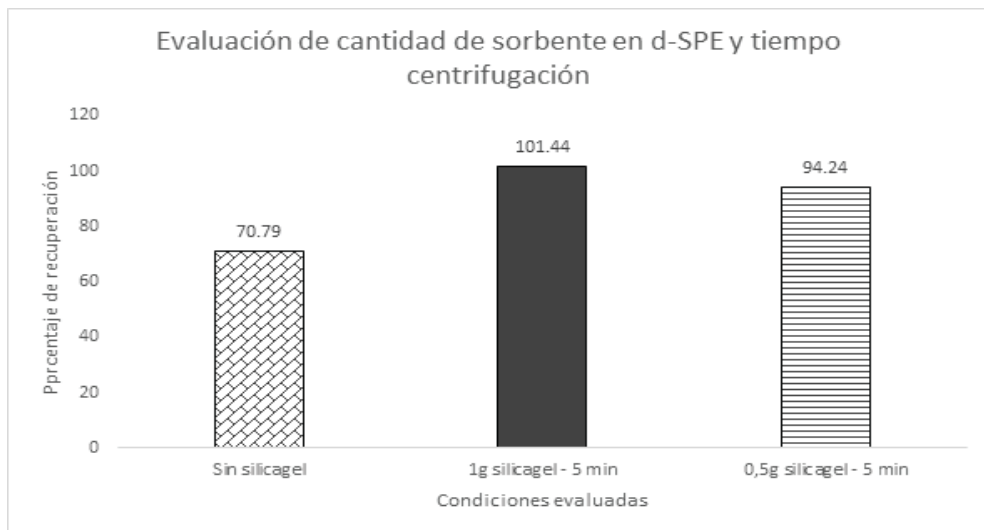
Pese a que el mayor porcentaje se encontró con un gramo de silicagel, la diferencia al utilizar la mitad de esa cantidad no es significativamente diferente, además de que puede existir una variación mayor a la diferencia de ambas pruebas, por lo que se decidió trabajar con la cantidad de 0,5 g de silicagel y un tiempo igual a 5 minutos de centrifugación. Con estos resultados, en la figura 4 se muestra el procedimiento esquematizado de la extracción optimizada.

Validación del método

Siguiendo las recomendaciones de la ICH, se procedió a validar los distintos parámetros que aparecen en la tabla 2, excluyendo el límite de detección y límite de cuantificación, debido a que no son necesarios cuando el método que se utiliza lleva como finalidad la valoración del analito presente en los supositorios.

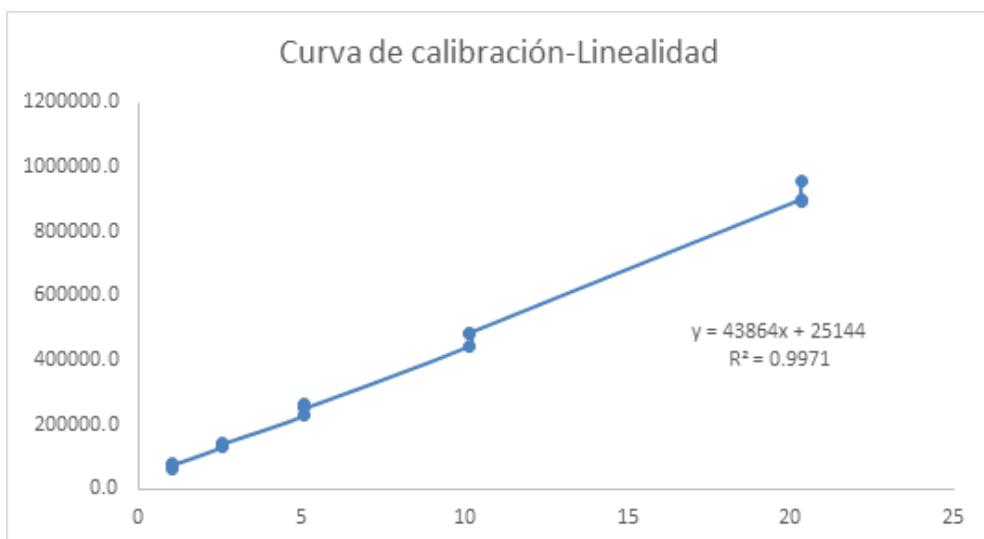
1. Especificidad: aprovechando que el detector con que cuenta el instrumento es uno de arreglo de diodos (DAD) y ya que se presentó la imposibilidad de contar con material de referencia de los productos de degradación y excipientes del preparado farmacéutico, se decidió evaluar la especificidad a través de la pureza de pico cromatográfico, comparando el espectro de absorción del acetaminofén de la figura 3, con el espectro de absorción teórico, con lo que se demostró que el pico corresponde al del analito de interés.
2. Linealidad y rango de trabajo: para la evaluación de la linealidad se preparó una curva de calibración por triplicado en días diferentes con concentraciones finales desde 1.0; 2.5; 5.0; 10.0 y 20.0 partes por millón (ppm) y a partir de los datos obtenidos se construyó la recta de calibración, se obtuvieron la pendiente, intercepto, coeficiente de correlación (r) y de determinación (r^2). En el gráfico 4 se muestra la recta de calibración en los tres días evaluados. Al revisar los datos obtenidos, los valores de r y r^2 cumplieron el criterio de aceptación, adicionalmente la revisión visual demostró la correcta linealidad en el rango de trabajo seleccionado. Finalmente, en el análisis de varianza (ANOVA), el valor de F calculado fue mayor al F tabulado, con lo cual se demostró que existe relación lineal entre las variables. La tabla 4 muestra el análisis estadístico practicado con los datos obtenidos y el cumplimiento de los criterios de evaluación. Debido a que el intervalo de trabajo es aquel donde se demuestra la linealidad del método, estos mismos resultados son los empleados para este parámetro.
3. Exactitud (veracidad): para este parámetro se fortificaron nueve muestras de supositorios que contenían acetaminofén de una marca comercial, a tres diferentes concentraciones, cada uno por triplicado, dentro del rango de linealidad, utilizando una solución estándar de analito con una concentración conocida para tener concentraciones de fortificación de 1, 5 y 20 ppm. Al evaluar los resultados obtenidos los coeficientes de variación obtenidos para los tres niveles de fortificación fueron menores al 3 % y los valores de t calculados fueron mucho más bajos que el t tabulado.

Gráfico 3. Optimización de d-SPE



Fuente: Creación propia.

Gráfico 4. Curva de calibración obtenida durante la evaluación de la linealidad del método



Fuente: Creación propia.

Figura 4. Esquema del procedimiento desarrollado

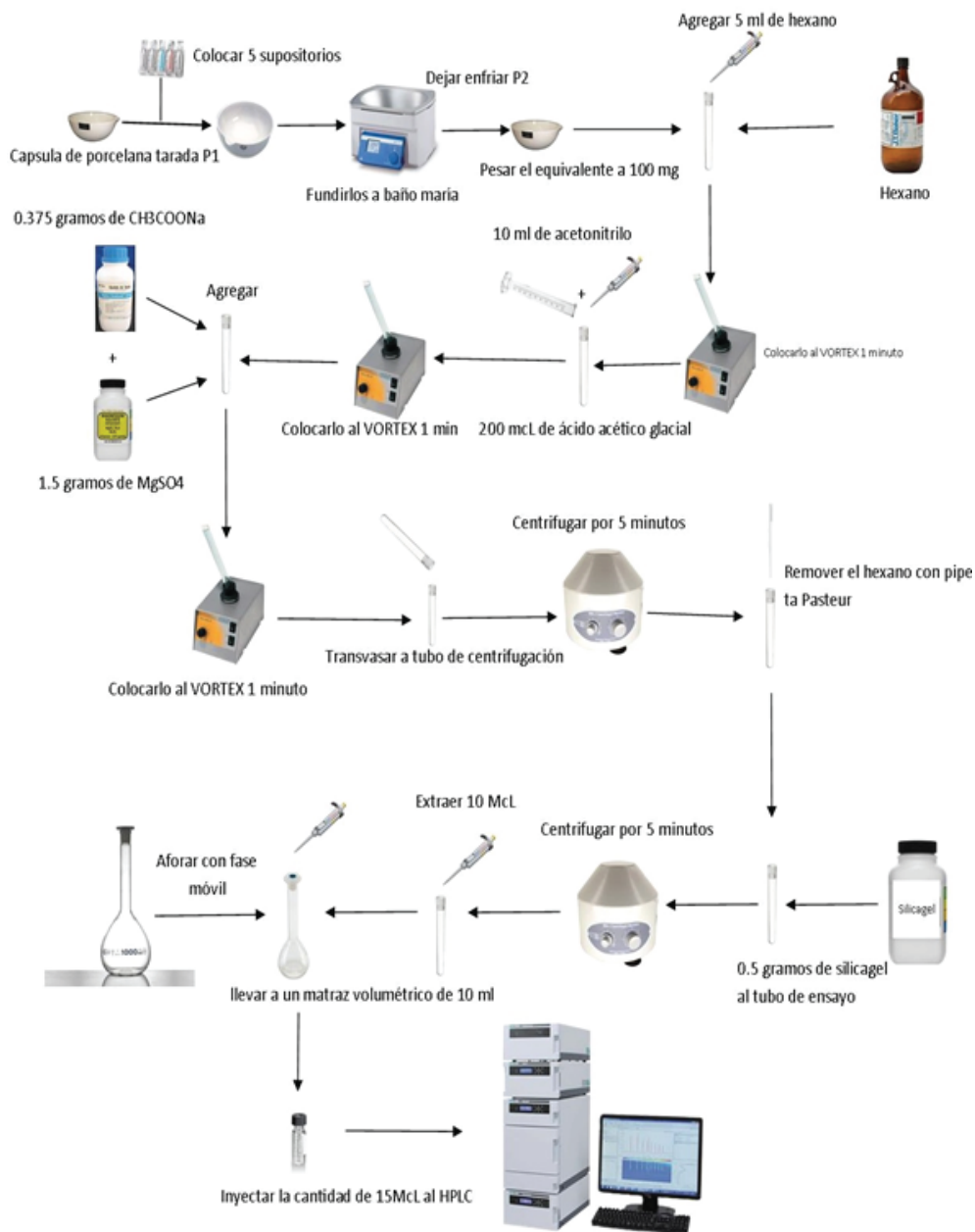


Tabla 4. Análisis de varianza para la linealidad del método

Fuente	Suma cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios del error	F calculado	F tabulado
Regresión lineal	Explicada	1	2.64654E+13	84.8423544	0.39160113
Residual	Inexplicada	13	3.11936E+11		
Total	Total	14			
alfa	0.05				

Hipotesis de prueba	Criterios de aceptación	Resultado
Prueba para la regresión	Si F calculado es mayor que F tabulado se rechaza Ho y existe relación lineal entre las variables	Cumple
Ho: concentración y señal no se relacionan lineal		
H1: concentración y señal se relacionan lineal		

Fuente: Creación propia.

4. Precisión: se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad intermedia del método. En el caso de la primera se analizaron seis muestras de supositorios a una concentración de 10 ppm, por el mismo analista en el mismo día y se obtuvo el coeficiente de variación, el cual resultó menor al 10 %. La precisión intermedia se evaluó para 2 analistas en diferentes días, con la determinación de seis muestras de supositorios de acetaminofén y calculando el coeficiente de variación de los resultados obtenidos. Asimismo, se practicó un análisis de varianza mediante un test t, cuyos resultados indicaron que no existen diferencias significativas en los resultados al cambiar el analista o el día del ensayo, puesto que el valor de t calculado fue mucho menor que el valor tabulado, como se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Análisis de varianza para la reproducibilidad intermedia

Concentración (ppm)	10				
Promedio Analista 1	S Analista 1	Varianza Analista 1	Promedio Analista 2	S Analista 2	Varianza Analista 2
83.97	7.65	58.65	106.61	11.84	140.28
Varianza estadística	Grados de libertad	t calculado	t tabulado		
99.46	8	-3.58	2.30		

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Si t calculado es menor que t tabulado se rechaza H_0 y el método tiene buena reproducibilidad intermedia	CUMPLE

Fuente: Creación propia.

CONCLUSIONES

La aplicación de métodos analíticos baratos, rápidos, sencillos y seguros, es cada vez más necesario en el campo del análisis farmacéutico, por ello el desarrollo de técnicas de tratamiento de muestra que faciliten el aislamiento del o los analitos de interés previo a la determinación instrumental ha ido ganando mucho terreno en la química analítica. Con la presente investigación se logró desarrollar una variante del método QuEChERS, disminuyendo la cantidad de reactivos, el tiempo de extracción, lo mismo que con un procedimiento más sencillo al método de referencia que establece la farmacopea de los Estados Unidos XXXV para supositorios de acetaminofén.

Los diferentes parámetros del método de extracción fueron optimizados, incluyendo el solvente de dilución, solvente extractor, utilización de tampón, cantidad de sales empleadas, tiempo de centrifugación y empleo de sorbente en la etapa SPE-dispersiva, de modo que el porcentaje de recuperación en la extracción sea lo más elevado posible. Adicionalmente, se empleó el método desarrollado para determinar la cantidad de acetaminofén que presentan presentaciones comerciales de supositorios.

En el caso de la separación cromatográfica, se empleó la que establece la farmacopea, utilizando la separación en fase reversa con una fase móvil compuesta por agua y metanol en proporción de 3 a 1. El pico del analito se observó antes de los tres minutos, por lo que el tiempo total de análisis fue de tan solo cinco minutos.

Posteriormente al desarrollo, se validó el método alternativo, empleando las recomendaciones de la ICH, evaluando los principales parámetros, dentro de los cuales se concluye que el método presentó una buena linealidad, así como una correcta especificidad. En cuanto a la exactitud se encontraron valores elevados de recuperación, muy cercanos al 100 % de las concentraciones evaluadas, pese a que el procedimiento de extracción conlleva etapas en las que se pueden tener pérdidas del analito.

Asimismo, los coeficientes de variación del método en la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad intermedia, no fueron mayores al 10 % en la mayoría de los ensayos, debido a que las condiciones del laboratorio no se encuentran controladas, lo que sin duda alguna puede ser corregido en laboratorios que cuenten con una estructura propicia para disminuir estas variaciones. Por ello, se puede afirmar que el método presenta características que lo hacen aplicable por cualquier laboratorio dedicado al control de medicamentos.

La investigación demostró que el desarrollo de métodos alternos a los que presentan las normativas oficiales es posible, haciendo procedimientos con menor consumo de reactivos, tiempo y menor uso de solventes tóxicos. Con ello se puede afirmar que el método QuEChERS con las variaciones del caso, pudiese ser utilizado para matrices farmacéuticas laboriosas como supositorios, óvulos y similares, con lo cual se puede pensar que investigaciones en esta línea de investigación pueden seguirse efectuando.

AGRADECIMIENTO

A las autoridades de la Facultad por la oportunidad de utilizar el cromatógrafo líquido del laboratorio instrumental, además de aportar todos los reactivos e insumos necesarios durante la experimentación. Al Grupo de Investigación Análisis Químico, por compartir sus conocimientos y experiencias durante la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Anastassiades, M. L. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 412-431.
- Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2012). *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention.
- Guideline, H. T. (2006). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use* (pág. 1). Estados Unidos de Norteamérica.

rica: ICH.

- Mitra, S. (2003). *Chemistry, Sample preparation techniques in analytical*. New Jersey: Wiley.
- Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Londres: Pharmaceutical Press.
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C., & Lucci, P. (2012). New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, 298-323.
- Ponce, H. (27 de Junio de 2014). Desarrollo de un método analítico para determinada medios yodados de contraste de rayos X en peces mediante LC-MS (HR). *Trabajo de Fin de Máster*. Tarragona, Tarragona, España: Universitat Rovira i Virgili.
- Roberts II, L., & Morrow, J. (2001). Analgésicos-Antipiréticos y antiinflamatorios, y fármacos antigotosos. En A. Goodman Gilman, J. Hardman, & L. Limbird, *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (págs. 697- 742). México, D.F.: McGrawHill.
- RTCA. (2010). para la evaluación de la calidad de los productos farmacéuticos, Validación de métodos analíticos. *Reglamento Técnico Centroamericano*, (pág. 1). Tegucigalpa, M.D.C.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to modern Liquid Chromatography*. Estados Unidos de Norteamérica: Wiley Sons.
- Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., & Chen, F. (2012). A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Cent. Eur. J. Chem.*, 900-.