

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE
METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAR Y
CUANTIFICAR CLORHEXIDINA DIGLUCONATO EN
UN GEL DE USO TÓPICO, MEDIANTE EL USO DE
HPLC Y DETECTOR UV-VIS**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas área de especialización en Industria por:

CAMILA PAZ ZULOAGA REBOLLEDO

Director de Tesis: Dr. Javier Morales Montecinos
Co-director de Tesis: Manuel Castillo

Santiago-Chile
Enero 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

CAMILA PAZ ZULOAGA REBOLLEDO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas, Área de Especialización: Industria, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Javier Morales Montecinos

Co-director de Tesis:

Manuel Castillo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Hernan Pessoa

Dr. Alexander Gamboa

Dr. David Vasquez

A Blanca, la fuente de amor y motivación de mi vida

AGRADECIMIENTOS

Eternamente agradecida de mis amigos, familia y pololo. Gracias por recorrer conmigo este camino, todas las veces que se ha puesto complicado, saber que los tengo ahí junto a mí ha sido tranquilizador. Gracias por su apoyo y amor incondicional. Agradecimientos especiales para Alpra y Dora, mis dos compañeras del día a día.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	6
INDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
MARCO TEÓRICO	20
OBJETIVO GENERAL	58
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
METODOLOGÍA	58
RESULTADOS.....	74
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIÓN.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	93
ANEXOS.....	101

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Condiciones cromatográficas método QC.CL01.62369 (3.0).	15
Tabla 2.	Resultados SST, método QC.CL01.62369 (3.0).	18
Tabla 3.	Lista de parámetros o características de validación típicos y sus definiciones.	29
Tabla 4.	Parámetros para evaluar en una validación según el tipo de ensayo a realizar.	32
Tabla 5.	Especificación estándar para agua de grado 1, según norma ASTM 1193:2001.	45
Tabla 6.	Condiciones instrumentales método N°1.	61
Tabla 7.	Gradiente fase móvil método N°1.	62
Tabla 8.	Soluciones método N°1.	62
Tabla 9.	Condiciones instrumentales método N°2.	63
Tabla 10.	Gradiente fase móvil método N°2.	63
Tabla 11.	Soluciones método N°2.	64
Tabla 12.	Parámetros cromatográficos y criterios numéricos de aceptación.	65
Tabla 13.	Parámetros de validación y criterios de aceptación utilizados en la validación de metodología analítica de identificación y cuantificación de un analito.	67
Tabla 14.	Metodología utilizada en la evaluación de los parámetros analíticos estudiados en la validación de métodos analíticos.	69
Tabla 15.	Datos cromatograma solución estándar (Figura 10).	76
Tabla 16.	Parámetros cromatográficos calculados para solución estándar (Figura 10).	76
Tabla 17.	Datos cromatográficos solución muestra (Figura 11).	77

Tabla 18. Parámetros cromatográficos calculados para solución muestra (Figura 11).	78
Tabla 19. Comparación y cumplimiento de los parámetros cromatográficos evaluados en solución muestra (Figura 11).	79
Tabla 20. Datos y parámetros cromatográficos solución estándar clorhexidina.	80
Tabla 21. Datos cromatograma solución muestra (Figura 13).	81
Tabla 22. Parámetros cromatográficos calculados para solución muestra (Figura 13).	82
Tabla 23. Comparación y cumplimiento de los parámetros cromatográficos evaluados en solución muestra (Figura 13).	82
Tabla 24. Resumen de resultados obtenidos en la validación del método N°2.	84
Tabla 25. Tabla comparativa: Dubal et. al (2016) v/s “Método N°2”	88
Tabla 26. Tabla comparativa: Havlikova et. al. (2007) v/s “Método N°2”	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de muestra de Endogel, método QC.CL01.62369 (3.0).	16
Figura 2. Cromatograma SST, método QC.CL01.62369 (3.0).....	17
Figura 3. Etapas (en bloques blanco) y documentación necesaria (en bloques grises) del proceso de validación de un método analítico.	27
Figura 4. Molécula de clorhexidina.	36
Figura 5. Cromatograma modelo y algunos parámetros de medición frecuente.	42
Figura 6. Diagrama general funcionamiento HPLC.	43
Figura 7. Cromatograma y pico cromatográfico para definición de TF.....	52
Figura 8. Espectro ultravioleta clorhexidina en solución.....	54
Figura 9. Cromatograma Solución Solvente.	75
Figura 10. Cromatograma Solución Estándar.....	75
Figura 11. Cromatograma Solución Muestra.	77
Figura 12. Cromatograma solución estándar clorhexidina.	80
Figura 13. Cromatograma solución muestra.	81

RESUMEN

Laboratorio Synthron Chile se encuentra ubicado en la Región Metropolitana, comuna de Lampa. Y corresponde al lugar en el cual se desarrolló el proyecto contenido en este documento. En la ejecución de este proyecto se utilizó “Endogel”, un producto farmacéutico terminado, fabricado por el Laboratorio Synthron Chile y consta de un gel de uso tópico empleado en ámbitos urológicos. Su formulación consta de 3 g de lidocaína clorhidrato y 0,05 g de clorhexidina digluconato por cada 100 mL de producto.

El punto inicial de este proyecto es un procedimiento correctivo, originado desde el Departamento de Control de Calidad del Laboratorio Synthron Chile. El suceso que motivó la acción correctiva fue el hallazgo de una no conformidad en los resultados obtenidos tras la ejecución del método vigente, con el cual se realizaban, en ese momento, los análisis de identificación y valoración de clorhexidina digluconato en Endogel.

El objetivo principal del proyecto es desarrollar e implementar un método analítico capaz de identificar y cuantificar clorhexidina digluconato en Endogel. Y de esta manera dar solución al problema inicial mencionado anteriormente. Para cumplir con dicho propósito se seleccionó a la Cromatografía líquida de alta eficiencia, acoplada a un detector UV-Vis, como técnica analítica.

Para cumplir con el fin propuesto se probaron dos métodos analíticos con distinto origen bibliográfico, y se compararon los resultados obtenidos para los parámetros cromatográficos estudiados. El método seleccionado presentó resultados dentro de los criterios de aceptación, lo

cual se relacionó con una correcta resolución y separación entre los componentes de la mezcla analizada. Luego de la elección, se comenzó con el proceso de validación.

Para realizar la actividad de validación, fue necesaria la creación del protocolo de validación, en donde se estableció la guía del proceso y, al tratarse de un método analítico utilizado para la identificación y cuantificación de un principio activo, se seleccionaron los siguientes parámetros analíticos para formar parte de la actividad de validación: SST, especificidad (o selectividad), linealidad, exactitud, precisión, rango, estabilidad de las soluciones y robustez.

De la ejecución de las pruebas que contempló el proceso de validación, se obtuvieron resultados conforme a los criterios de aceptación establecidos para todos los parámetros estudiados, exceptuando la robustez. Esto permitió concluir que el método desarrollado no presenta la posibilidad de ser sometido a variaciones en las condiciones establecidas para su funcionamiento. Sin embargo, esto no afectó a la hora de concluir que el método analítico desarrollado es idóneo para su uso previsto por el hecho de cumplir con las pruebas necesarias para concretar su correcta validación.

Como última actividad en el desarrollo de este proyecto, se realizó la documentación final del proceso de validación. Se generó un reporte de validación que contiene los resultados obtenidos y la conclusión del cumplimiento de la validación para el método estudiado.

ABSTRACT

Laboratorio Synthón Chile is located in the Metropolitan Region, in the municipality of Lampa, and it corresponds to the place where the project contained in this document was developed. In the development of this project "Endogel" was used, a finished pharmaceutical product, manufactured by Laboratorio Synthón Chile and consists of a gel for topical use used in urological areas. Its formulation consists of 3 g of lidocaine hydrochloride and 0.05 g of chlorhexidine digluconate per 100 mL of product.

The starting point of this project is a corrective procedure, originated from the Quality Control Department of the Synthón Chile Laboratory. The event that motivated the corrective action was the finding of a non-conformity in the results obtained after the execution of the current method, with which, at that time, the identification and titration analysis of chlorhexidine digluconate in Endogel were carried out.

The main objective of the project is to develop and implement an analytical method capable of identifying and quantifying chlorhexidine digluconate in Endogel. And in this way give a solution to the initial problem mentioned above. To fulfill this purpose, high performance liquid chromatography coupled to a UV-Vis detector was selected as the analytical technique.

To fulfill the proposed goal, two analytical methods with different bibliographic origins were tested, and the results obtained for the chromatographic parameters studied were compared. The selected method presented results within the acceptance criteria, which were related to a correct resolution and separation between the components of the analyzed mixture. After the selection, the validation process began.

To carry out the validation activity, it was necessary to create the validation protocol, where the process guide was established and since it is an analytical method used for the identification and quantification of an active principle, the following analytical parameters were selected to be part of the validation activity: System suitability test (SST) specificity (or selectivity), linearity, accuracy, precision, range, stability of the solutions and robustness.

From the execution of the tests contemplated in the validation process, results were obtained that were within the acceptance criteria established for all the parameters studied, except for robustness. This allowed concluding that the developed method does not present the possibility of being subjected to variations in the conditions established for its operation. However, this did not affect the conclusion that the analytical method developed is suitable for its intended use because it complies with the tests necessary for its correct validation.

As the last activity in the development of this project, the final documentation of the validation process was carried out. A validation report was generated containing the results obtained and the conclusion of the validation compliance for the method studied.

INTRODUCCIÓN

Laboratorio Synthon es un laboratorio e industria farmacéutica, y se encuentra ubicado en la Región Metropolitana, comuna de Lampa. Este laboratorio comenzó a operar en los años 1950 bajo el nombre de “Laboratorios Rider”. En 1961 crea su propia planta de producción, donde 30 años más tarde, decide especializarse en la fabricación de sólidos, cápsulas y semisólidos. Posteriormente logra la certificación de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP, por su nombre en inglés *Good Manufacturing Practices*), otorgada por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), la cual se mantiene hasta hoy en día (Synthon, s.f. a).

En 2007, la empresa fue adquirida por *Synthon Holding BV*, una compañía farmacéutica con sede en Holanda que se dedica al desarrollo, registro, producción y comercialización de productos genéricos bioequivalentes a nivel mundial. Luego de 6 años, en 2013, se inauguró la planta más moderna de Chile y, actualmente, la única en poseer una certificación de la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por su nombre en inglés *European Medicines Agency*), que permite a este laboratorio exportar sus productos a Europa (Synthon, s.f. a).

Este laboratorio está dividido en áreas, una de estas corresponde a la Gerencia de Operaciones Analíticas, que alberga al Departamento de Control de Calidad, y al Grupo de Tecnologías Analíticas (ATG, por su nombre en inglés *Analytical technologies group*). Este proyecto se llevó a cabo específicamente en ATG (Synthon, s.f. a)

Laboratorio Synthon produce medicamentos sólidos y semisólidos, que se utilizan en la prevención y tratamiento de patologías ligadas con distintas áreas médicas como: oncología, neurología, psiquiatría, medicina general y urología, entre otras. El desarrollo del presente trabajo se encuentra ligado con un producto farmacéutico terminado, perteneciente al espectro

de medicamentos fabricados por Laboratorio Synthron Chile, con uso en el ámbito urológico, y que lleva por nombre “Endogel” (Synthron, s.f. a).

Endogel es un producto terminado, cuya forma farmacéutica corresponde a un gel de uso tópico, y su composición está dada por 3 g de lidocaína clorhidrato y 0,05 g de clorhexidina digluconato por cada 100 mL de producto. Se utiliza como anestésico y antiséptico urológico, normalmente empleado en exploraciones urológicas como lubricante de catéteres y sondas (Synthron, s.f. b).

El presente proyecto se originó de la apertura de una acción correctiva, entendida como la acción mediante la cual se busca eliminar la causa de una no conformidad u otra situación indeseable detectada. El procedimiento mencionado nació por parte del Departamento de Control de Calidad del Laboratorio Synthron, quienes detectaron una no conformidad en los resultados obtenidos, en ese momento, desde el método analítico utilizado para la identificación y valoración de clorhexidina digluconato en Endogel (ICH, 2008).

El método en cuestión se identifica por su código interno QC.CL01.62369 (3.0) para propósitos de este documento. Esta metodología utilizaba como técnica analítica la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por su nombre en inglés *High Performance Liquid Chromatography*), acoplada a un detector UV. Específicamente, la técnica denominada Cromatografía de Pares Iónicos (IPC, por su nombre en inglés *Ion-Pair Chromatography*), la cual se considera una modificación de la Cromatografía Líquida de Fase Reversa (RPLC, por su nombre en inglés *Reversed-Phase Liquid Chromatography*).

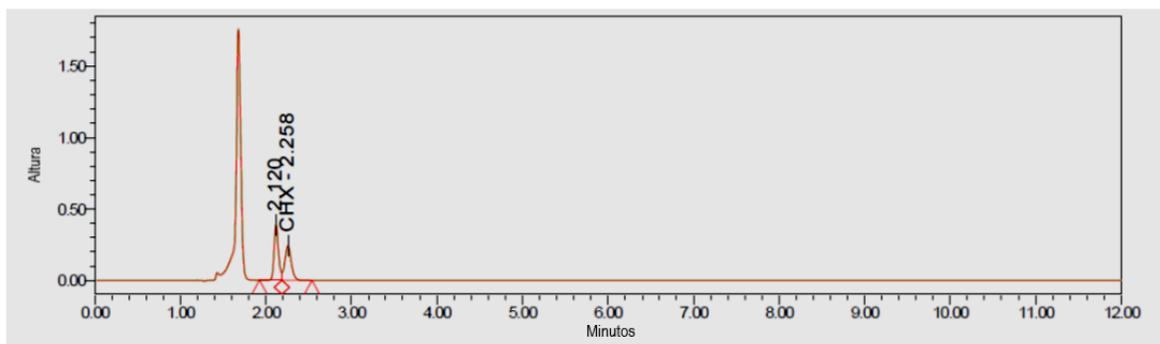
Tabla 1. Condiciones cromatográficas método QC.CL01.62369 (3.0).

Equipo	: HPLC Agilent
Columna	: RP-8, 4,6 x 25 cm o equivalente
Temperatura del horno	: 25 °C
Velocidad de flujo	: 2,0 mL/min
Volumen Inyección	: 20 µL
Tiempo de corrida	: 12 minutos
Tiempos de retención aprox.	: 2,5 min clorhexidina digluconato
Detector	: UV
Longitud de onda	: 254 nm

Las condiciones cromatográficas que utilizaba el método QC.CL01.62369 (3.0) se exponen en la Tabla 1. Este método presenta como fase móvil una mezcla compuesta por un disolvente más débil (A) junto a un disolvente más fuerte (B). La solución A contiene *PIC-B8* (sal sódica del ácido 1-octanosulfónico) disuelto en agua, y la solución B está compuesta por metanol. La composición de este eluyente está en una proporción A: B 27:73 respectivamente, y, además, se ajusta a pH 3,0 con ácido acético concentrado. La composición de la fase móvil es fija en todo el tiempo de corrida cromatográfica, es decir, corresponde a una elución isocrática (Dolan & Snyder, 2013).

Los resultados obtenidos con el método QC.CL01.62369 (3.0), que alarmaron al Departamento de Control de Calidad, se presentan en las Figuras 1 y 2, y en la Tabla 2.

Figura 1. Cromatograma de muestra de Endogel, método QC.CL01.62369 (3.0).



Nota: Obtenido y adaptado desde Software Empower3.

La Figura 1 corresponde al cromatograma de la muestra (Endogel), en el que se evidenció una baja resolución entre el pico cromatográfico de clorhexidina digluconato (CHX) y el pico cromatográfico anterior. Asimismo, se obtuvo un tiempo de retención (t_R) para CHX de 2,258 minutos, mientras que el t_R del componente que eluye antes de la CHX fue de 2,120 minutos.

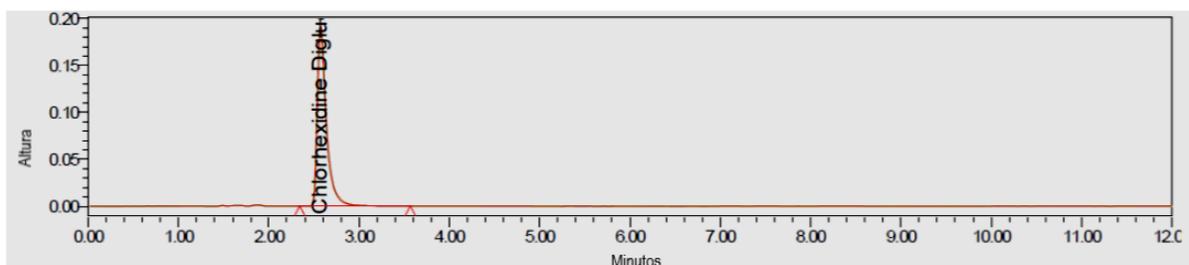
Con los datos extraídos de la Figura 1, se obtuvo un valor para la resolución (R_s) de estos picos igual a 1,1. Esto indica que el método anteriormente utilizado por el laboratorio no tenía la capacidad de separar correctamente estos dos componentes que presentaban una elución próxima entre sí.

Por otro lado, en la Figura 2 y Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la Prueba de Idoneidad del Sistema (SST, *System Suitability Test*). El SST es una parte integral de los métodos de cromatografía líquida, y se usa para verificar que el sistema cromatográfico es adecuado para el análisis previsto.

Los resultados obtenidos indicaron un problema cromatográfico, que por sus características se consideró para este proyecto, un problema de menor relevancia que el expuesto

en la Figura 1, sin embargo, se consideró su solución como parte de este proyecto. En la Tabla 2 se presentan los valores obtenidos para el factor de *tailing* (TF, por su nombre en inglés *Tailing Factor*), los cuales resultaron ser cercanos al límite superior del rango establecido por el laboratorio como criterio de aceptación, ya que el valor de TF en el SST de este método se encuentra aceptado cuando presenta un valor $\leq 2,0$ (USP, 2012).

Figura 2. Cromatograma SST, método QC.CL01.62369 (3.0).



Nota: Obtenido y adaptado desde Software Empower3.

TF, es un parámetro que entrega información sobre la forma del pico cromatográfico. Los picos con TF elevados, u otras deformaciones, presentan problemas en la cuantificación ya que algunos sistemas de datos tienen dificultades para medir con precisión el tamaño de los picos. Como resultado, la precisión de los métodos de ensayo que involucran dichas deformaciones es a menudo inferior en comparación con una cromatografía en donde los picos cromatográficos presentar mayor simetría (*i.e.*, valores de TF cercanos a 1) (Cazes, 2001).

Tabla 2. Resultados SST, método QC.CL01.62369 (3.0).

	Nombre de muestra	Nombre analito	Tiempo de retención	Área ($\mu\text{V}*\text{seg}$)	Altura (μV)	Platos teóricos	TF
1	SST	CHX	2,6	1352569	191821	3574	1,8
2	SST	CHX	2,6	1351621	191536	3576	1,8
3	SST	CHX	2,6	1354264	191963	3573	1,8
4	SST	CHX	2,6	1352758	191998	3575	1,8
5	SST	CHX	2,6	1352466	191805	3576	1,7
Promedio			2,6	1352735		3575	1,8
%RSD			0,1	0,1			

El propósito del proyecto presentado se relaciona con el concepto de calidad. La calidad de un medicamento es definida (DS N°3, 2010) como “aptitud del medicamento para el uso para el cual se destina, la que está determinada por su eficacia, seguridad y estabilidad, conforme a las características de identidad, potencia, pureza y otras, conforme al respectivo registro sanitario” (DS N°3, 2010). El objetivo principal del presente trabajo es desarrollar e implementar un método analítico capaz de identificar y cuantificar clorhexidina digluconato en Endogel, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con detector UV-Vis.

La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por su nombre en inglés *Food and Drug Administration*) plantea (Center for Drug Evaluation and Research, 2021) que la calidad farmacéutica es la base que permite a los pacientes y consumidores tener confianza en la seguridad y eficacia de sus medicamentos. La calidad

farmacéutica es una característica importante tanto para cumplir con los propósitos de la industria, como también para la confianza que se genera desde el paciente hacia su tratamiento.

El control de calidad en la industria farmacéutica corresponde a todas las actividades que se realizan para garantizar el cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos para un medicamento específico. Además, es una herramienta que se utiliza en las actividades como auditorias y revisiones, las cuales son realizadas tanto de manera interna como por parte de entidades reguladoras. Dentro de las tareas que son responsabilidad del control de calidad, está la creación de evidencia tangible de las pruebas realizadas dentro del laboratorio, datos que representan un respaldo a la hora de demostrar el cumplimiento de dichas características, o su no conformidad, según sea el caso (DS N°3, 2010).

El control de calidad de los productos farmacéuticos, se realiza por medio de la implementación de metodologías analíticas capaces de comprobar distintas propiedades o requisitos del producto analizado. Cuando se busca probar una propiedad definida, de un principio activo o producto farmacéutico, contra los criterios de aceptación establecidos para dicha característica, se debe desarrollar un procedimiento analítico (FDA, 2015).

El método o procedimiento analítico, que se obtuvo como producto del desarrollo de este proyecto, utiliza como técnica analítica la HPLC acoplada a un detector UV-Vis. La HPLC, como se mencionó anteriormente, es una técnica analítica y se usa para realizar la separación cromatográfica de los componentes que conforman una mezcla. Uno de los detectores más utilizados acoplados a HPLC es el detector UV-Vis, las características de ambos instrumentos, y el fundamento relacionado con la ejecución del método, son temas presentes en este documento (Snyder et al., 2010).

El método obtenido, para poder ser implementado y utilizado en la industria farmacéutica, necesitó ser sometido al proceso de validación. La validación de un método analítico es una herramienta crucial para la industria farmacéutica (AEFI, 2001), ya que es la forma mediante la cual se establece que “un procedimiento analítico conducirá con alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos” (p.62(AEFI, 2001)).

MARCO TEÓRICO

1. Industria farmacéutica y agencias reguladoras

La industria farmacéutica, es un componente del sistema sanitario y realiza tanto investigaciones, como también fabrica y comercializa productos farmacéuticos, biológicos y dispositivos médicos. Estos productos son utilizados para el tratamiento agudo/crónico de ciertas patologías, y el diagnóstico de enfermedades (Felton, 2013). El Ministerio de Salud de Chile determinó que el rol de los fabricantes o industria farmacéutica es “proveer de medicamentos de un alto estándar de calidad, seguridad y eficacia; y que cumplan con todos los requisitos legales respecto al envase y su rotulado” (MINSAL, 2016).

El Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH, por su nombre en inglés *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), es un proyecto internacional en curso, que reúne a las autoridades reguladoras y a la industria farmacéutica para discutir los aspectos científicos y técnicos del registro de medicamentos. Esta organización se

creó en el año 1990 y fue fundada por miembros reguladores de Europa, Estados Unidos y Japón. Actualmente es reconocida como una asociación internacional sin fines de lucro cuya misión (ICH, 2021) consiste en “lograr una mayor armonización en todo el mundo para garantizar que los medicamentos seguros, eficaces y de alta calidad se desarrollen y registren de la manera más eficiente en cuanto a recursos” (párr.1).

El objetivo del ICH ha sido prevenir la repetición de las pruebas llevadas a cabo durante la investigación y desarrollo de nuevos fármacos. Y asimismo ha buscado maneras de lograr una mayor armonización en la interpretación y aplicación de las directrices técnicas y requisitos para obtener registros sanitarios. La armonización que se desea conseguir, se basa en la implementación y desarrollo de las directrices propuestas por el ICH. . Estos documentos son elaborados a través de un proceso de consenso científico, en donde se lleva a cabo un trabajo en conjunto, con expertos tanto del área de regulación como de la industria farmacéutica (ICH, 2021).

La Comisión Europea (EC, por su nombre en inglés *European Commission*) es el único miembro regulador supranacional del ICH, dado que el mismo marco regulador sobre productos farmacéuticos es aplicable en todos los estados miembros de la Unión Europea (UE, por su nombre en inglés *European Union*). Otro organismo europeo que se debe mencionar es la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por su nombre en inglés *European Medicines Agency*), una entidad descentralizada de la UE responsable de la evaluación científica, supervisión y seguimiento de la seguridad de los medicamentos en los países miembros de la unión (ICH, 2021a; EMA, 2018).

En el ICH, la EMA proporciona a la EC su apoyo técnico y científico, además coordina la experiencia científica entregada por parte de los países miembros de la UE, a través del Comité de Medicamentos de Uso Humano

Otro de los miembros reguladores fundadores del ICH es la FDA, entidad que corresponde a la agencia integral de protección al consumidor más antigua del gobierno federal de los EE. UU. Su misión es ser responsable de proteger la salud pública garantizando la seguridad y la eficacia de los medicamentos, productos biológicos, y dispositivos médicos de uso humano y veterinario (FDA, 2021).

Con respecto al contexto nacional, en Chile la autoridad reguladora es el Instituto de Salud Pública (ISP), la cual no forma parte del ICH. El ISP es la entidad encargada de las autorizaciones y fiscalizaciones del sector industrial farmacéutico de nuestro país. Este instituto corresponde a un servicio público autónomo en gestión, pero dependiente del MINSAL para la aprobación de sus políticas.

Las entidades reguladoras son organizaciones con un enfoque común: la promoción y protección de la salud. Estas organizaciones buscan generar garantías relacionadas a la calidad de los medicamentos. Poder evaluar la calidad de estos ayuda a brindar tratamientos efectivos que conduzcan a usar de forma efectiva los recursos en la atención médica, permitiendo que se puedan reinvertir (Ozawa et al., 2020).

Las organizaciones mencionadas en esta sección influyen en el Laboratorio Synthon Chile según las relaciones que poseen entre sí. Este laboratorio cuenta con una certificación en

GMP por parte del ISP. Adicionalmente, para generar documentación interna. Synthon utiliza la orientación entregada por las directrices del ICH.

Por otra parte, a este laboratorio se le permite exportar medicamentos a Europa, ya que posee una certificación de la EMA emitida para este fin. Finalmente, la relación entre el laboratorio y la FDA corresponde al siguiente objetivo del laboratorio: obtener una certificación por parte de la FDA que transforme al Laboratorio Synthon Chile en el primer laboratorio farmacéutico en el país con autorización para exportar medicamentos hacia Estados Unidos (Synthon, s.f. a)

2. Concepto de Sistema de Calidad en la industria farmacéutica

Tal como se mencionó anteriormente, el rol de la industria farmacéutica es proveer medicamentos de un alto estándar de calidad, seguridad y eficacia. El concepto de calidad toma diferentes enfoques dependiendo del contexto en el cual se utilice. Cuando se habla en materia de salud, la FDA (Center for Drug Evaluation and Research, 2021) considera la calidad farmacéutica como la base que permite a los pacientes y consumidores tener confianza en la seguridad y eficacia de sus medicamentos. La misma entidad señala que la calidad está dada por un conjunto de características establecidas en el producto farmacéutico, que están diseñadas para garantizar los niveles requeridos de seguridad y eficacia (FDA, 2006).

Por otra parte, el ICH presenta dos definiciones para el concepto de calidad. La primera define calidad (ICH,1999) como la idoneidad de una sustancia farmacéutica o un producto farmacéutico para su uso previsto, y menciona que este término incluye atributos tales como identidad, fuerza y pureza. La segunda definición está enfocada a la gestión de calidad (ICH,

2005b), donde se indica como el grado en que un conjunto de propiedades inherentes de un producto, sistema o proceso cumple con los requisitos.

Un sistema de gestión de calidad es definido (ISO, 2005) como “conjunto de elementos de una organización, en materia de calidad, interrelacionados o que interactúan para establecer políticas, objetivos y procesos para lograr estos objetivos” (sección 3.5.3). La ICH, en su guía Q10, expone una directriz en materia de calidad, sobre un sistema de gestión de calidad que se conoce como Sistema de Calidad Farmacéutica (PQS, por su nombre en *Pharmaceutical Quality System*). El PQS es un sistema de gestión capaz de dirigir y controlar a la industria en materia de calidad (ICH, 2008).

Es importante para este proyecto hacer referencia al PQS ya que, como se mencionó en la introducción, este proyecto se originó de una acción correctiva implementada por parte del Departamento de Control de Calidad del Laboratorio Synthron Chile. Las acciones correctivas forman parte del Sistema de Acciones Correctivas y Preventivas (CAPA, por su nombre en inglés *Corrective and Preventive Actions*). Este sistema junto a otros tres elementos conforman el PQS, que se encuentra detallado en la guía Q10: “Sistema de Calidad Farmacéutica” del ICH (ICH, 2008).

La FDA describe que el Sistema CAPA tiene como propósito “recopilar y analizar información, para identificar e investigar problemas en los productos y/o su calidad, y tomar acciones correctivas y/o preventivas apropiadas y efectivas para prevenir su recurrencia” (FDA, 2014). En la Guía Q10 del ICH se plantea que “la empresa farmacéutica debe tener un sistema para implementar acciones correctivas y preventivas resultantes de la investigación de quejas,

rechazos de productos, no conformidades, retiradas, desviaciones, auditorías, inspecciones regulatorias y hallazgos, y tendencias del desempeño del proceso y monitoreo de la calidad del producto” (ICH, 2008).

El PQS está destinado a ser utilizado junto con los requisitos de GMP. Las GMP actúan bajo el principio de que las operaciones de producción deben seguir procedimientos claramente definidos de acuerdo con las autorizaciones de fabricación y comercialización, con el objetivo de obtener productos con la calidad requerida (World Health Organization, 2020). Las buenas prácticas de manufactura se definen como “normas técnicas mínimas establecidas para todos los procedimientos destinados a garantizar la calidad uniforme y satisfactoria de los productos farmacéuticos, dentro de los límites aceptados y vigentes para cada uno de ellos” (DS N°3, 2010).

El control de calidad corresponde al procedimiento que permite asegurar y demostrar el cumplimiento de las GMP. Este procedimiento es realizado mediante la implementación de metodologías analíticas, las cuales permiten probar una propiedad definida de un principio activo o producto farmacéutico, contra los criterios de aceptación establecidos (Red PARF, 2010).

El procedimiento analítico se refiere a la forma de realizar el análisis y, la manera por la que se establece que dicho procedimiento conducirá con alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos, es a través de la correcta validación del procedimiento analítico en cuestión (AEFI, 2001)

3. Validación de un método analítico

La validación de una metodología analítica es definida por la Farmacopea de Estados Unidos (USP, por su nombre en inglés *United States Pharmacopeia*) (USP, 2017) como “el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de rendimiento del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas” (USP, 2017). Por su parte, la FDA define la validación de un método como el proceso en el cual se establecen las características de rendimiento y limitaciones de un método, adicionalmente a la identificación de las influencias que pueden cambiar estas características y en qué medida (FDA, 2020).

El ISP (Sandoval, 2010) por su parte establece que “la validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables” (p.8). Es importante que exista una persona asignada como responsable de realizar dicha tarea, para asegurar que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. La Figura 3 representa un esquema general del proceso de validación de un método analítico, en donde se representa con recuadros no agrisados las etapas que comprenden el proceso de validación y con recuadros grises los dos documentos principales que son necesarios para efectuar y respaldar dicha actividad.

Figura 3. Etapas (en bloques blanco) y documentación necesaria (en bloques grises) del proceso de validación de un método analítico.



Para realizar una validación el primer paso es poseer un método analítico con un objetivo o fin propuesto, en el cual se base todo el proceso de validación. Antes de realizar una validación, es necesario definir adecuadamente las condiciones en que el procedimiento ha de emplearse.

El primer documento de la actividad de validación es el “Protocolo de validación”. En él se encuentra la guía que debe seguir el proceso de validación, contiene todas las condiciones y aspectos relevantes para el proceso. Se define el sistema a validar, se menciona el objetivo del método analítico que se validará y se identifican los parámetros analíticos a evaluar, finalmente se presenta el diseño del plan experimental bajo el cual se realizará la validación (World Health Organization, 1992).

Otro componente del protocolo de validación, son los criterios de aceptación o aceptabilidad. Estos corresponden (Sandoval, 2010) a “exigencias de una característica de funcionamiento o comportamiento en función de las cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados confiables” (AEFI, 2001).

La FDA (2015) en su guía para la industria “Validación de procedimientos y métodos analíticos para fármacos y productos biológicos”, señala que los datos de validación deben ser generados bajo un protocolo aprobado por el laboratorio, tomando en consideración las GMP, con la descripción de la metodología de cada característica de validación y criterios de aceptación predeterminados y justificados, utilizando instrumentación calificada.

En la Tabla 3 se presenta una lista de las características o parámetros típicos en conjunto con sus definiciones, que se evalúan en un proceso de validación. Las definiciones presentadas fueron obtenidas de la Guía Q2 (R1) “Validación de procedimientos analíticos: Texto y metodología”, y el capítulo de la USP-NF <1225> “Validación de procedimientos compendiales de la farmacopea estadounidense” (USP, 2017).

Hay un parámetro analítico, no considerado en la tabla 3, que se encuentra relacionado estrechamente con la robustez del método analítico. Cuando las mediciones son susceptibles en las variaciones analíticas, estas deben controlarse adecuadamente y deben incluirse como parte de una declaración de precaución en el procedimiento. Tras medir la robustez de un método, con los resultados obtenidos se establece una serie de parámetros que son evaluados cada vez que se utilice el procedimiento analítico. La evaluación de estos parámetros se conoce como SST, y su objetivo es garantizar que la validez del procedimiento se mantenga cada vez que este se ejecute (USP, 2017).

Tabla 3. Lista de parámetros o características de validación típicos y sus definiciones

Característica de validación	Definición
Exactitud	La exactitud de un procedimiento analítico es la cercanía de los resultados de la prueba obtenidos por ese procedimiento con el valor real.
Precisión	La precisión de un procedimiento analítico expresa la proximidad de la concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.
Especificidad o selectividad	La especificidad o selectividad corresponde a la habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Por lo general, estos pueden incluir impurezas, productos de degradación, matriz, etc.
Límite de detección	El límite de detección corresponde a la cantidad más baja de analito que puede detectarse en una muestra, pero no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas.
Límite de cuantificación	El límite de cuantificación es la cantidad más baja de analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptable, en las condiciones experimentales indicadas.
Linealidad	La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o mediante una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un rango dado.
Rango	El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre las concentraciones inferior y superior, incluyendo estos niveles, en la cual se ha demostrado que se puede determinar la concentración de analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento tal como se encuentra escrito.
Robustez	La robustez de un procedimiento analítico es una medida de la capacidad de este para no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método, y proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

La elección de los parámetros o características a evaluar en la validación se establece según el objetivo o propósito para el cual fue creado el método. La discusión sobre la validación de procedimientos analíticos se dirige a los cuatro tipos más frecuentes (ICH, 2005a):

- a. Pruebas de identificación
- b. Pruebas cuantitativas de contenido de impurezas
- c. Pruebas límite para el control de impurezas
- d. Pruebas cuantitativas de la fracción activa, en muestras de sustancia o producto farmacéuticos, u otros componentes seleccionados en el producto farmacéutico.

Las pruebas de identificación se encuentran destinadas a garantizar la identidad de un analito en una muestra. Esto se realiza mediante la comparación de una propiedad de la muestra con la de un estándar de referencia. Las propiedades de la muestra que se utilizan para la comparación suelen ser: espectroscopía infrarroja, de absorción molecular (UV-Vis) y de masa, comportamiento cromatográfico de un analito, reactividad química, etc. (ICH, 2005a).

Con respecto a las pruebas cuantitativas de la fracción activa, en muestras de sustancia o productos farmacéuticos, u otros componentes seleccionados en el producto farmacéutico. Estas pruebas o metodologías analíticas están destinadas a medir un analito presente en una muestra determinada. Estas pruebas también se conocen como pruebas de valoración o cuantificación, y representa una medida cuantitativa de los componentes principales del fármaco (ICH, 2005a).

En la Tabla 4 se presenta un resumen de los parámetros a evaluar en una validación, según el tipo de ensayo a analizar. Los símbolos (-) representan que el parámetro no es

normalmente evaluado, mientras que los símbolos (+) representan que el parámetro es normalmente evaluado.

Luego de la elaboración del protocolo de validación, como se muestra en la Figura 3, se realiza la validación y posteriormente se evalúan los resultados obtenidos. En las dos actividades mencionadas se debe tener registro de los datos primarios, de forma tal que estos sean auditables (AEFI, 2001).

Como última etapa del proceso de validación está la elaboración del “Reporte de validación”, este documento es elaborado por el analista y/o el encargado de la validación, y contiene los resultados obtenidos y las conclusiones que emergen de estos.

Actualmente, el almacenamiento de datos se realiza de manera manual en el cuaderno del analista encargado de la validación, pero también mediante registros electrónicos generados mediante softwares. Estos últimos permiten la operación automatizada de los equipos de análisis, y la obtención de resultados para las mediciones y/o pruebas realizadas. Estos resultados permanecen respaldados de manera electrónica, con el objetivo de poder acceder a ellos en caso de necesitarlos.

El analista, o responsable de la validación, anteriormente era el encargado de realizar los cálculos matemáticos, comparativos y/o estadísticos correspondientes. Actualmente se obtienen automáticamente desde los softwares utilizados en el análisis. Los resultados obtenidos se someten a un proceso de evaluación que analiza cada parámetro analítico estudiado, y se concluye si los resultados de las pruebas cumplen o no los criterios de aceptación establecidos en el protocolo (Sandoval, 2010).

Tabla 4. Parámetros para evaluar en una validación según el tipo de ensayo a realizar.

PARÁMETRO	Analito		Impurezas/ Pureza		
	Identificación	Valoración o cuantificación	Límite	Contenido	Pureza por normalización interna
Prueba de idoneidad del sistema	+	+	+	+	+
Especificidad	+	+	+	+	+
Linealidad	+	+	+	+	+
Límite de detección	-	-	+	-	-
Límite de cuantificación	-	-	-	+	+
Precisión (repetibilidad, precisión intermedia)	-	+	-	+	+
Exactitud	-	+	-	+	+
Rango	-	+	-	+	+
Robustez	+	+	+	+	+
Estabilidad de las soluciones	+	+	+	+	+

En el laboratorio debe estar disponible el procedimiento usado para la validación, y un documento donde se declare que el método se ajusta para su uso propuesto (Sandoval, 2010). Existen ciertas directrices sobre la información que debe estar contenida en este último documento, la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, en su guía sobre validación de métodos analíticos, propone la información importante que se debiese incluir en el reporte de validación (AEFI, 2001):

- Referencia al protocolo en el cual se describe el procedimiento para la determinación de cada uno de los parámetros a evaluar.
- Resultados de las determinaciones de cada parámetro incluyendo todos los datos primarios.
- Referencias de la calibración y cualificación de los instrumentos utilizados, además de los resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad del sistema antes de iniciar el estudio de validación.
- Discusión de los resultados y conclusiones, y su posterior rechazo o aceptación.

Esta información es similar a la presentada en las guías de la FDA y el ISP. Por esto dichos documentos son la referencia directa utilizada en la elaboración del Procedimiento operativo estándar del Laboratorio Synthon para validaciones de metodologías analíticas.

Cuando se cumple de manera satisfactoria la validación de un procedimiento analítico, algunos laboratorios emiten un documento formal de aprobación, que recibe el nombre de certificado de validación y contiene un compilado de los resultados obtenidos por el laboratorio para cada parámetro (Sandoval, 2010).

4. Elección del método y técnicas analíticas

El proceso de selección de un método analítico adecuado (para lograr dar respuesta a un problema analítico específico) es una etapa crítica en la implementación de una nueva metodología analítica. La selección del método analítico, realizada para cumplir con el objetivo principal de este proyecto, se basó principalmente en dos libros especializados en análisis instrumental y selección de métodos analíticos (Moldoveanu & David, 2017a); (Douglas A. Skoog et al., 2008).

En ambos documentos se expone la información necesaria que se debe recopilar previamente para realizar la selección de un método analítico. Dicha información está enfocada en dar respuesta a ciertas interrogantes y satisfacer aspectos tales como:

- a. **Propósito del análisis:** el propósito del análisis desarrollado en este proyecto es cuantificar e identificar clorhexidina digluconato en Endogel. El análisis corresponde a una evaluación de calidad de un producto terminado, exactamente un medicamento llamado Endogel, un gel de uso tópico que se emplea con fines urológicos para anestesia y desinfección de la uretra. El principio activo que proporciona el efecto anestésico es la lidocaína clorhidrato, mientras que el efecto antiséptico desinfectante es dado por la clorhexidina digluconato. Además de estos dos principios activos, Endogel posee tres excipientes: propilparabeno, metilparabeno y methocel (Synthon, s.f. b).
- b. **Información general sobre las muestras:** la información sobre la muestra que se analizó considera aspectos químicos y físicos. El gel analizado es una mezcla de cinco componentes, dos de ellos principios activos y los otros tres cumplen rol de excipientes.

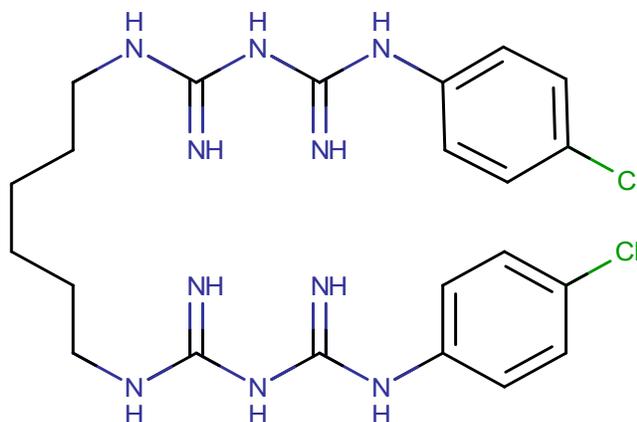
Las especificaciones del producto terminado (Fabiola Espinoza S., s. f.) describen físicamente al medicamento como “gel viscoso, transparente o ligeramente opalescente”. Además, se precisa en el documento un pH entre 5,0 – 7,0 y una densidad entre 1,0 – 1,1 g/mL.

c. Componentes de la muestra y propiedades fisicoquímicas: tal como se mencionó anteriormente, la muestra corresponde a una mezcla con cinco componentes, los cuales se detallarán a continuación:

- Clorhexidina digluconato: es uno de los dos principios activos de la formulación, y el analito de interés en la realización de este proyecto. La clorhexidina corresponde a un compuesto orgánico cuya molécula, presentada en la Figura 4, está compuesta por dos anillos 4-clorofenil y dos grupos biguanida unidos por una cadena central de hexametileno (Greenstein et al., 1986).

En soluciones con pH ácido, la clorhexidina tiene cuatro cargas positivas deslocalizadas sobre los diez átomos de Nitrógeno, mientras que en soluciones con pH neutros (o débilmente alcalinos), la molécula se comporta de forma di catiónica. Por otro lado, sus propiedades fisicoquímicas (medidas experimentalmente) presentan valores para la solubilidad en agua de 0,800 mg/mL a 20 °C, y un valor de log P correspondiente a 0,08 con la molécula ionizada a pH 5 (Hansch et al., 1995).

Figura 4. Molécula de clorhexidina.



Nota: Tomado de molekuul.be (2022).

- Lidocaína clorhidrato: es el segundo principio activo de la formulación, la lidocaína se comporta como una base débil, y posee un pKa cercano a 7,7. El valor experimental para la solubilidad en agua para este compuesto es de 4,1 mg/mL, mientras que para el valor de log P corresponde a 2,44 (Tetzlaff, 2000).
- Metilparabeno: se utiliza como preservante en formulaciones farmacéuticas. Los parabenos son compuestos aromáticos que presentan un ácido benzoico esterificado con un grupo alquilo, y sustituido en posición para con un grupo hidroxilo. El metilparabeno es un compuesto ácido que presenta un pKa de 8,17 y su solubilidad en agua a 25°C es de 0,25 g/100mL (Jewell et al., 2007). El valor de log P calculado experimentalmente es de 1,96 (Rodríguez de Jorge, 2018).
- Propilparabeno: es utilizado en formulaciones farmacéuticas como preservante, el propilparabeno es un compuesto orgánico ácido que presenta un pKa experimental de 8,35 y su solubilidad en agua a 25°C es de 0,05 g/100mL. Posee un valor experimental de log P de 3,04 (Rodríguez de Jorge, 2018).

- Hipromelosa: denominada químicamente hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), es un polímero semisintético con un valor calculado para log P de 0,304. La HPMC es un polímero proveniente de la celulosa sustituido con grupos metoxi e hidroxipropilo, presenta un carácter no iónico y es soluble en agua. Como componente de Endogel se utiliza la HPMC con el nombre comercial METHOCEL™.

Los éteres de celulosa METHOCEL™ son polímeros a base de celulosa naturales, no tóxicos y solubles en agua, incluyen metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC o hipromelosa). Son de carácter no iónico y estable en un amplio rango de pH (ChemPoint, s.f.). En el laboratorio Synthron Chile utilizan en la fabricación de Endogel los siguientes tipos de METHOCEL:

- METHOCEL™ E15 Premium LV: espesante de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de bajo peso molecular. Produce una viscosidad de 12 – 18 cPs al 2% en agua. Es un polímero HPMC soluble en agua con una sustitución de hidroxipropilo moderada (7 – 12 %) y un alto contenido de metoxi (28 – 30 %)(Mallon, 2014). Las soluciones que contienen METHOCEL™ E15 Premium LV se gelifican de forma reversible a temperaturas superiores a 64 °C (Nutrition & Biosciences USA 1, LLC, 2018) .
- METHOCEL™ K4M: espesante de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de peso molecular medio. Posee una sustitución de hidroxipropilo moderada (7 – 12%) y un contenido de metoxi inferior al grado E15 Premium LV, específicamente de 19-24%. Produce una viscosidad de 3000 - 5600 cPs al 2 % en agua(Mallon, 2014). Posee estabilidad de pH en ambientes ácidos y alcalinos, lo que lo

convierte en un modificador de reología versátil que se puede usar en muchas formulaciones diferentes. METHOCEL™ K4M en solución gelifica de forma reversible a temperaturas superiores a 90 °C (Dow Chemical Company Limited, 2018)

- Methocel E3 Premium LV: espesante de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), produce una viscosidad de 2,4 – 3,6 cPs al 2% en agua. Es un polímero HPMC soluble en agua con una sustitución de hidroxipropilo moderada (7 – 12 %) y un alto contenido de metoxi (28 – 30 %)(Mallon, 2014)

d. Calidad y exactitud requerida de los resultados: el método seleccionado debe ser capaz de identificar y cuantificar clorhexidina digluconato en un gel de uso tópico, con la correspondiente precisión y exactitud. La exactitud corresponde a la proximidad de un resultado, o la media de un conjunto de mediciones con respecto al valor real. El criterio de aceptación con el cual trabaja el Laboratorio Synthon al realizar las validaciones de métodos analíticos, está especificado en el procedimiento operativo estándar interno del laboratorio. Este documento se encuentra elaborado siguiendo las directrices proporcionadas en los documentos de la FDA y el ICH en donde se aborda la temática de validación de métodos analíticos (FDA, 2020). Para la exactitud se busca que el porcentaje de recuperación de la muestra individual esté entre el 98 % -102 % en cada nivel investigado.

La precisión de un ensayo corresponde a la concordancia entre un conjunto de mediciones repetidas sin asumir el conocimiento del valor real. La precisión proporciona una medida del error aleatorio o indeterminado del análisis, y el criterio de aceptación

establecido por el laboratorio es de una desviación estándar relativa (RSD) entre las muestras analizadas menor o igual al 2,0% (FDA, 2020)

e. Disponibilidad de instrumentación, experiencia en el laboratorio y financiamiento:

la elección de un procedimiento analítico involucró la evaluación de factores como la disponibilidad de la instrumentación y el financiamiento. Para la ejecución del presente proyecto, estaban a disposición todos los equipos de análisis que contiene el laboratorio de control de calidad del Laboratorio Synthron Chile. Los equipos que ahí se encuentran corresponden a cromatógrafos de gases y líquidos.

Con respecto al financiamiento, Laboratorio Synthron otorgó medios económicos para la compra de columnas cromatográficas, además de reactivos y material de laboratorio que se necesitó para llevar a cabo la implementación de una metodología analítica que cumpla con el objetivo de este proyecto.

Con la información expuesta es importante destacar que el método desarrollado trata de un análisis tanto del tipo cualitativo como cuantitativo, además de que la muestra corresponde a una mezcla de componentes conocidos y no volátiles. Cuando las muestras tienen más de un componente, como en este caso, las técnicas cromatográficas suelen ser necesarias para una separación inicial de estos compuestos. Cuando las muestras tienen un número limitado de componentes, que se sabe que están potencialmente presentes, técnicas cromatográficas como HPLC y Cromatografía en Capa Fina (TLC, *Thin-layer Chromatography*) pueden ser útiles para identificar la composición de la muestra (Moldoveanu & David, 2017).

La elección de HPLC como paso analítico se realiza para analizar muestras que contienen como analitos moléculas pequeñas con volatilidad media y baja, también se analizan moléculas de mayor tamaño, en las cuales se encuentran compuestos sintéticos y biopolímeros. La HPLC tiene la capacidad de separar mezclas complejas, y en conjunto con un detector, realiza una cuantificación precisa y sensible (Moldoveanu & David, 2013).

Se consideró además la facilidad, conveniencia, y capacitaciones que requiere el analista para llevar a cabo la ejecución del método. En este caso, la mayoría de las muestras procesadas y analizadas por el Laboratorio Syntho Chile utilizan HPLC junto a un detector. Todo lo mencionado respalda la elección de HPLC como método analítico, además, como se menciona al comienzo de este documento, la metodología utilizada anteriormente por el laboratorio para efectuar el análisis que se propone en el presente proyecto era mediante el uso de HPLC acoplado a detector UV (Douglas A. Skoog et al., 2008).

4.1. Terminología de uso común y parámetros de medición frecuente

En esta sección se presentan términos cromatográficos relacionados al desarrollo de este proyecto. Los términos que se enumeran a continuación no corresponden a la totalidad de términos existentes en la bibliografía, pero corresponden a los de uso y medición más frecuente:

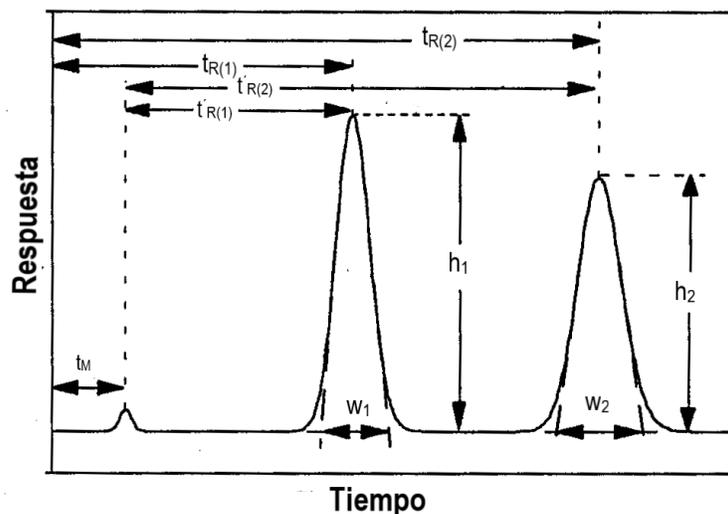
- Ancho de pico (w): corresponde al ancho de pico en la línea de base, se ilustra para el primer y segundo pico en la figura 5. Las tangentes se dibujan a cada lado del pico (a través de los puntos de inflexión) y su intersección con la línea de base determina el valor de W (Quattrochi y cols., 1992).

$$W = 4\sigma$$

- Altura del pico cromatográfico (h): distancia entre el máximo de la señal y la línea base (Quattrochi y cols., 1992)
- Cromatograma: gráfico resultante de la señal obtenida por el detector contra el tiempo (Snyder et al., 2010).
- Fase móvil: solvente o mezcla de solventes utilizado para transportar la mezcla en un sistema cromatográfico (Snyder et al., 2010).
- Fase estacionaria: medio estacionario, que puede ser un líquido a granel estancado, una capa líquida sobre una superficie sólida o una capa interfacial entre un líquido y un sólido (Fanali et al., 2017).
- Línea de base: línea horizontal en la zona inferior del cromatograma en donde solo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto (Quattrochi y cols., 1992)
- Pico cromatográfico: señal registrada en el cromatograma por una especie que sale de la columna y pasa por el detector (Snyder et al., 2010).
- Tiempo muerto (t_M): tiempo que tarda una especie no retenida en llegar al detector (Andrea Weston & Phyllis R. Brown, 1997).
- Tiempo de retención (t_R): tiempo que tarda un soluto específico (especie retenida) en llegar al detector (Andrea Weston & Phyllis R. Brown, 1997).
- Tiempo de retención relativo o ajustado (t'_R): tiempo en que una sustancia permanece efectivamente en la fase estacionaria (Snyder et al., 2010).

$$t'_R = t_R - t_M$$

Figura 5. Cromatograma modelo y algunos parámetros de medición frecuente.



Nota: Extraído y adaptado de Quattrochi et al. (1992).

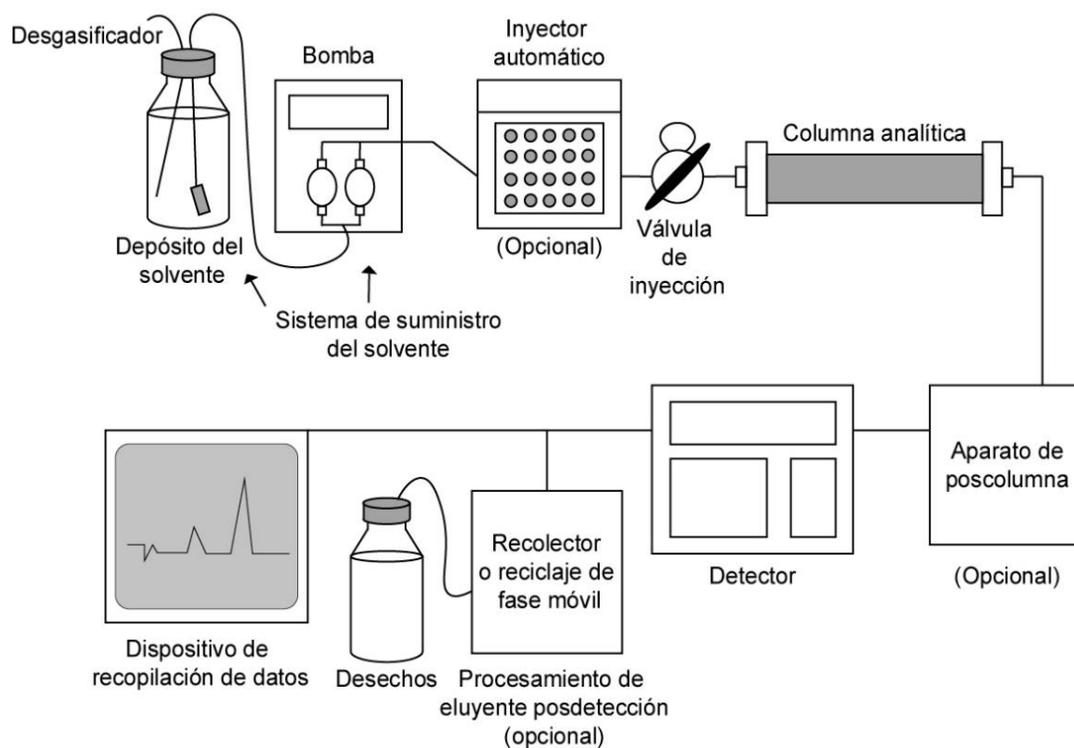
La HPLC utiliza alta presión para forzar a la fase móvil, y los analitos disueltos en esta, a pasar a través de una columna cerrada con partículas en su interior que constituyen la fase estacionaria. En la figura 6 se presenta un diagrama de un sistema genérico de HPLC, el cual comprende la instrumentación típica, tal como: depósito o reservorio del solvente (fase móvil), bomba, inyector o dispositivo de introducción de muestras, columna cromatográfica, detector, sistema recolector de fase móvil, dispositivo de recopilación de datos y tuberías de conexión.(Fanali et al., 2017).

4.2. Componentes más comunes en un sistema genérico de HPLC

En esta sección se presenta una descripción de los componentes comunes en un sistema HPLC ((Quattrochi y cols., 1992), (Snyder et al., 2010),(Andrea Weston & Phyllis R. Brown, 1997), y (Fanali et al., 2017)).

- a. **Fase móvil:** En la cromatografía líquida la fase móvil tiene por función disolver y transportar la muestra. La composición de esta fase móvil dependerá de la naturaleza de los analitos a separar, de la fase estacionaria y del mecanismo de separación que se usa.

Figura 6. Diagrama general funcionamiento HPLC.



Nota: Extraído y adaptado (Fanali et al., 2017)

El agua es utilizada comúnmente como componente de la fase móvil en HPLC, se precisa el uso de agua de alta pureza con el fin de evitar contaminantes que pudieran generar reacciones no deseadas con compuestos de la muestra (analitos u otros) o en la fase estacionaria. Estos contaminantes además pueden producir daños en otros componentes del sistema cromatográfico, como es el caso de las columnas.

Según la clasificación de aguas para uso de laboratorios de la norma 1193:2001 establecida por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM, por su nombre en inglés *American Society for Testing and Materials*), el agua que se recomienda para utilizar en los equipos HPLC corresponde al grado 1 (ASTM, 2001).

Este grado debe poseer las especificaciones que se presentan en la Tabla 5

En los laboratorios es posible obtener este tipo de agua con un sistema de purificación adecuado, y se le conoce como agua *Milli-Q* o *Nano-Q*. La conductividad eléctrica del agua utilizada en HPLC debe poseer un valor bajo, ya que esto implica la existencia de una baja cantidad de contaminantes que transporten cargas, como el caso de metales y sales.

- b. Reservorio o depósito de solvente:** consiste en un recipiente de un material que debe ser inerte, que no reaccione con la fase móvil contenida, y además debe ser limpiado con regularidad. El tamaño del recipiente se encuentra relacionado con el consumo esperado, por lo general debe tener la capacidad de contener de 0,5 a 2 L de disolvente. Se debe usar una cubierta para evitar que el polvo entre en el depósito y, asimismo, para minimizar la evaporación de la fase móvil. El depósito no debe taparse herméticamente, dado que esto hace que se forme un vacío cuando se bombea la fase móvil.

Se crea una conexión que enlaza el depósito con la bomba, que posee una pieza en su extremo inicial que actúa como un peso para mantener la tubería de entrada en el fondo del depósito, su función principal es proporcionar una filtración de respaldo para eliminar las partículas que podrían entrar en el depósito.

Tabla 5. Especificación estándar para agua de grado 1, según norma ASTM 1193:2001.

Característica	Valor
Conductividad eléctrica Max. ($\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C)	0,0555
Resistividad eléctrica Min. ($\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ @ 25°C)	18,0
pH a 25°C	--
Carbono orgánico total (TOC, del inglés <i>Total organic carbon</i>) Max. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	50
Sodio Max. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	1
Cloruro Max. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	1
Silica total Max. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	3
Cuando sea necesario controlar los niveles bacterianos, se deben presentar los siguientes valores:	
Recuento total de bacterias Max. (UFC/100 ml)	1
Endotoxinas Max. (UE/ml)	0,03

Nota: Extraído y adaptado de (ASTM, 2001).

- c. Bomba:** las bombas en HPLC tienen el propósito de entregar un flujo de fase móvil preciso, exacto, reproducible, constante y sin pulsos. La fase móvil proveniente del reservorio del solvente es llevada hacia el inyector y, desde ahí, a la columna.

La bomba de jeringa fue muy utilizada antes de la existencia de los equipos automatizados, la principal ventaja del uso de esta bomba es la ausencia de pulsos, pero actualmente es muy poco utilizada por ser incompatible con el análisis de caudales mayores a 1 mL/min.

En la actualidad destaca el uso de las bombas de pistones, existen bombas de uno y dos pistones, y forman parte de los sistemas automatizados de HPLC. Una bomba de un pistón entrega solvente de manera permanente, pero su funcionamiento genera discontinuidad del flujo (lo que es visualizado como un pulso). Este hecho resulta ser indeseable para el análisis, por lo cual se contempla el uso de reductores de pulso, o el empleo de dos o más pistones de funcionamiento sincrónico.

La bomba de dos pistones puede atenuar las pulsaciones, y existen de dos tipos: en serie y en paralelo. La primera se caracteriza por usar dos pistones idénticos que trabajan a diferente velocidad, mientras que en las del segundo tipo cada pistón trabaja de manera independiente, entregando la misma cantidad de solvente. Ambas entregan solvente de manera continua y libre de pulsaciones.

d. Inyector: corresponde a un dispositivo de introducción de muestras, que trabaja cumpliendo esta función en los sistemas HPLC sin despresurizarlos. La introducción de la muestra en la columna requiere una cantidad medida de esta solución a la fase móvil presurizada que fluye.

La inyección manual fue muy utilizada anteriormente cuando no existían inyectoros automáticos. Pero para el análisis actual se utiliza un inyector automático, en donde la precisión obtenida en los análisis es, en general, superior a los inyectoros manuales, ya que no dependen de la habilidad del operador.

Los inyectoros automáticos, además de poseer la válvula de inyección y el mecanismo que permite su correcto llenado, están equipados con un dispositivo que aloja

las muestras a inyectar, generándose un proceso de inyección automatizado prácticamente en su totalidad.

- e. **Columna analítica:** es descrita como el “corazón del sistema HPLC”, al ser el lugar en donde ocurre la separación de los componentes de la muestra. En la actualidad, se puede encontrar una gran variedad de columnas, estas poseen diferencias y modificaciones que las hacen útiles en la solución a problemáticas relacionadas a la separación de muestras.

La columna analítica en HPLC es un cilindro que contiene la fase estacionaria en donde ocurre la separación de los analitos de interés presentes en la muestra. En algunos análisis se decide por el uso de una pre-columna, ubicada entre el inyector y la columna analítica, y cumple la función de eliminar los componentes de la muestra que son fuertemente adsorbidos antes de que la muestra llegue a la columna analítica. De esta manera se permite prolongar la vida útil de columnas usadas en análisis de este tipo. Resulta óptimo que la columna y pre-columna presenten similitud, por esto el diámetro interno de la pre-columna debe ser lo más similar posible al de la columna analítica y, tanto la fase estacionaria como el tamaño de partícula, deberían ser iguales.

La columna analítica comúnmente se encuentra fabricada en acero inoxidable o un polímero inerte como PEEK (que corresponde a polieter-éter-cetona). Y en su interior, se encuentra constituida por un relleno en donde se encuentra la fase estacionaria.

El material de relleno más utilizado es la silicagel, un sólido amorfo y poroso que corresponde a un Óxido de Silicio (SiO_2) hidratado. Presenta sus átomos metálicos

internos enlazados por un átomo de oxígeno, lo que lleva el nombre de puentes siloxano (Si-O-Si). Los átomos de silicio (Si) superficiales se encuentran unidos a grupos hidroxilos (-OH) conformando los grupos silanoles (Si-OH), responsables de la actividad superficial de este material.

El material de empaque sirve para aumentar el área de superficie específica por unidad de volumen, y conduce a una mejora de la cinética de transferencia de masa y la eficiencia de la columna. El material de empaque se compone de un conjunto de partículas, las que se pueden caracterizar por su configuración (o tipo), dimensiones físicas (diámetro de partícula), naturaleza y tamaño de los poros dentro de la partícula.

Las características físicas de la columna, como el diámetro interno y su largo, son importantes de considerar, ya que influyen en condiciones cromatográficas. Cuanto mayor sea el diámetro interior, mayor será la capacidad de carga de la muestra y el caudal. La mayoría de las columnas analíticas tienen un diámetro interno de 2 a 5 mm.

Por otra parte, la longitud de la columna afecta tanto a la eficiencia como a la velocidad de separación, las columnas más largas dan como resultado tiempos de análisis más prolongados, pero la eficiencia de la columna tiende a aumentar con la longitud. En general, las columnas cortas se utilizan para separaciones simples. Las columnas analíticas pueden tener una longitud de 30 a 300 mm.

La eficiencia de una columna es medida a través del número de platos teóricos (N). La teoría de platos considera que una columna cromatográfica se compone de varias secciones delgadas o platos, en las cuales ocurre un equilibrio para el soluto entre la fase

estacionaria y la fase móvil. Cuanto más delgados resulten ser estos platos teóricos, mayor será su cantidad dentro de la columna. El cálculo de N puede ser realizado de la siguiente forma:

$$\text{Número de plato teórico } (N) = \frac{L}{HETP}$$

Otra forma de calcular N relaciona el tiempo de retención con el ancho del pico cromatográfico en la línea base, de la siguiente manera:

$$\text{Número de plato teórico } (N) = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

N se relaciona con la capacidad relativa de una columna para producir picos cromatográficos estrechos. El ensanchamiento de los picos cromatográficos presenta una disminución en N y, por ende, en la eficiencia de la columna.

Hay parámetros cromatográficos que brindan información acerca del proceso de separación y su calidad. Estos parámetros son de importancia para este proyecto, a continuación, se exponen brevemente:

- Factor de retención (k): Algunas veces denominado “factor de capacidad”, es definido como la cantidad de soluto presente en la fase estacionaria, dividido por la cantidad de este en la fase móvil. El factor de retención de una columna es una medida directa de la fuerza con la que interactúa la muestra con el material de empaque y está definido por la expresión:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

- Factor de separación o selectividad (α): brinda información sobre la selectividad del sistema cromatográfico y corresponde a la diferencia entre los tiempos de retención o volumen, entre dos picos cromatográficos determinados. Es definido igualmente como la relación de los factores de capacidad (k) de dos analitos.

La selectividad del sistema cromatográfico describe la eficacia con la que un sistema puede separar dos compuestos (mientras mayor sea α , mayor es la habilidad de separación del sistema). El factor de separación se calcula mediante:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} ; \text{para } k_2 > k_1 \quad \text{ó} \quad \alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} ; \text{para } t'_{R2} > t'_{R1}$$

- Resolución (R_s): término utilizado para describir el grado de separación entre picos cromatográficos de solutos adyacentes. R_s relaciona la diferencia de los tiempos de retención (t_R) y ancho del pico en la línea base (w), de la siguiente manera:

$$R_s = \frac{2 [t_{R(2)} - t_{R(1)}]}{w_1 + w_2} ; \text{para } t_{R(2)} > t_{R(1)}$$

La siguiente ecuación presenta otra posibilidad de calcular la resolución, la cual se ve afectada por la selectividad (α), eficiencia (N) y capacidad (k) de la columna, de la siguiente forma:

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) \left[\frac{k}{(1+k)}\right] (\alpha - 1) N^{0,5}$$

Cuando dos compuestos presentan tiempos de retenciones cercanos, es posible encontrar valores para R_s cercanos o inferiores a 1,0. Un valor para R_s que demuestre que un método es capaz de separar dos componentes que presentan una elución contigua es $R_s \geq 1,5$ e, incluso, $R_s \geq 2,0$ dependiendo de la forma que presente el pico cromatográfico.

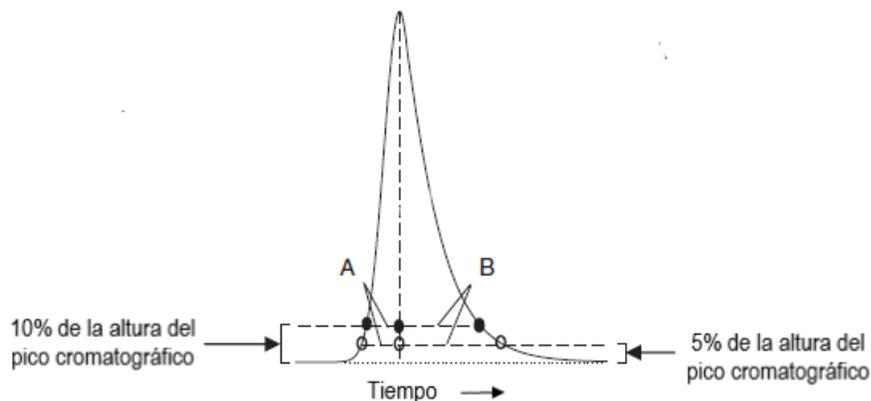
- Factor de tailing (TF): El *tailing* es un fenómeno de asimetría del pico cromatográfico, los picos cromatográficos obtenidos se apartan ligeramente de una forma gaussiana simétrica, mostrando más o menos cola. La cola del pico cromatográfico se presenta en la Figura 7, y se calcula de la siguiente manera:

$$TF = \frac{(A + B)}{2A}$$

Los valores para el cálculo de T son tomados al 5% de la altura del pico cromatográfico. El TF se relaciona con la separación de los componentes de la muestra, ya que, mientras aumenta la cola del pico cromatográfico, empeora progresivamente la separación.

- f. Aparato post-columna:** ubicado entre la columna analítica y el detector. En el aparato post-columna se realizan modificaciones requeridas para la fase móvil o analitos, para obtener mejores resultados en el análisis. En este aparato se puede modificar la fase móvil para mejorar la compatibilidad de esta con el detector, o derivatizar el analito para mejorar sus propiedades de detección luego de su separación.

Figura 7. Cromatograma y pico cromatográfico para definición de TF.



Nota: Extraído y adaptado (Snyder et al., 2010).

g. Detector: es el componente del equipo cromatográfico que permite detectar y cuantificar cada componente de una muestra al salir de la columna cromatográfica. Cuando el efluente transita desde la columna hacia el detector, en donde alguna propiedad química o física del analito se transduce a una señal eléctrica, la cual puede ser amplificada y manipulada por componentes electrónicos adecuados. Esta señal eléctrica es proporcional al nivel de alguna propiedad de la fase móvil o solutos.

El detector más utilizado actualmente fue introducido en el año 1966, se trata del detector UV. Los detectores de absorbancia no son destructivos y responden solo a sustancias que absorben radiación en la longitud de onda de la fuente de luz. Se clasifican como detectores selectivos o de propiedades de soluto, porque la fase móvil se elige de manera que presente poca o ninguna absorbancia en la longitud de onda de interés. Este detector posee buena sensibilidad y rango lineal, además permite detectar analitos en el

orden de los nanogramos y permite ser empleado con gradiente de solventes, siendo poco sensible a los cambios de caudal y temperatura.

La concentración del analito en la muestra se determina por la aplicación de la *Ley de Beer*, la cual relaciona la absorbancia con la concentración de una sustancia, de la siguiente manera:

$$A = \varepsilon b C$$

En donde A es la absorbancia de la sustancia, ε es la absorptividad molar del analito, b el camino óptico de la celda medido en cm, y C la concentración del analito en la muestra expresada en moles/L.

4.3. Fundamentos en la elección del detector UV

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó un detector UV acoplado a HPLC para permitir la cuantificación de la molécula de interés. Con respecto a la elección del detector a utilizar, se presenta a continuación el fundamento de esta:

El término cromóforo se utiliza para describir el sistema que contiene los electrones responsables de la absorción en el espectro UV que presenta una molécula, estos cromóforos son los componentes básicos de los espectros, y están asociados con la estructura molecular y los tipos de transición entre orbitales moleculares (Burgess, 2017).

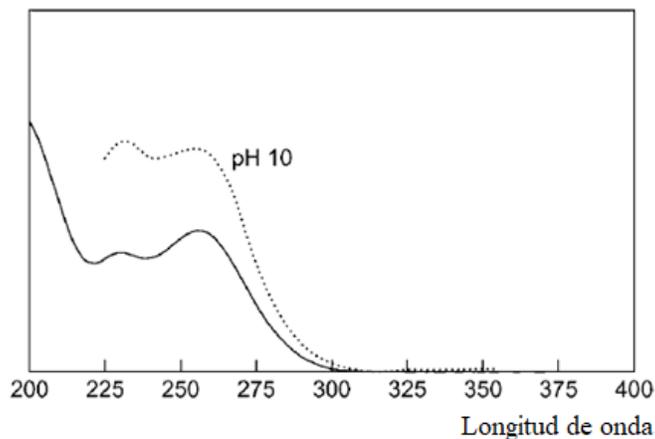
Existen tres tipos de orbitales moleculares en estado fundamental: orbital enlazante sigma (σ), orbital enlazante pi (π) y orbital no enlazante n (n). Este último es ocupado por los electrones desapareados provenientes de heteroátomos como el O y N que no intervienen en el enlace. Existen dos tipos de orbitales en estado excitado: orbital anti enlazante sigma (σ^*) y

orbital anti enlazante π^*). A partir de estos se observan transiciones en la región UV (Burgess, 2017).

La absorción de luz en la región UV y visible (con longitud de onda λ entre 200 nm y 800 nm) es causada por las transiciones electrónicas en la molécula absorbente que pasa a un estado energético superior. Los detectores UV-Vis responden a la concentración instantánea del soluto que pasa por el detector, y el rango de longitud de onda es típicamente entre 195 nm y 600 nm. Por debajo de 195 nm, los disolventes comunes utilizados como fase móvil tienen una absorción significativa, lo que hace que el rango no sea apto para su uso (Moldoveanu & David, 2017b).

En la Figura 8 se presenta el espectro ultravioleta de la clorhexidina, el cual resulta ser favorable a las condiciones anteriormente mencionadas, dependiendo del pH de la solución, presenta *peaks* de absorbancia en longitudes de onda comprendidas en el rango de 232 - 253 nm (Anthony C Moffat et al., 2011).

Figura 8. Espectro ultravioleta clorhexidina en solución.



Nota: Extraído y adaptado de (Anthony C Moffat et al., 2011).

Las transiciones electrónicas responsables de la absorción de luz UV y visible tienen lugar preferentemente entre los niveles de energía correspondientes al orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO, por su nombre en inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*), y el orbital molecular desocupado de más baja energía (LUMO, por su nombre en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Las moléculas en el estado excitado regresan al estado fundamental mediante procesos no radioactivos cuando la energía se disipa típicamente como calor (Moldoveanu & David, 2017c).

La energía involucrada en las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$ puede corresponder a absorciones de UV a una longitud de onda superior a 200–220 nm, o caer en la región visible (por encima de 360 nm). Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ son características de moléculas que contienen enlaces π . Por lo tanto, de moléculas con grupos como $>C=C<$, $>C=O$, $-C\equiv$, $>C=S$, $-N=N-$, etc. (Moldoveanu & David, 2017c).

En la molécula de clorhexidina se observa la presencia de insaturaciones correspondientes a los grupos $N=C$ y $C=C$, estos enlaces presentan electrones π y σ , mientras que los electrones desapareados del N se encuentran en los orbitales n. Las transiciones electrónicas que presenta esta molécula son todas las ya mencionadas, pero la energía implicada en las transiciones en $\sigma \rightarrow \sigma^*$ o en $n \rightarrow \sigma^*$ suelen ser bastante grandes, y corresponden a longitudes de onda cortas λ en la región ultravioleta lejana (por debajo de 220 nm), por lo que el espectro de absorción de la clorhexidina es explicado entonces por las transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$ que presenta la molécula (Moldoveanu & David, 2017c).

4.4. Métodos de separación en HPLC

Los métodos de separación cromatográfico en HPLC más comunes son la cromatografía en fase normal, fase reversa, intercambio iónico y exclusión molecular. Los métodos analíticos probados y expuestos en este proyecto utilizan la Cromatografía líquida de fase reversa (Andrea Weston & Phyllis R. Brown, 1997).

La Cromatografía líquida de fase reversa, conocida con la sigla RPLC, RPC o simplemente RP, es el método de separación por HPLC más utilizado. Entre un 75 y 90% de todas las separaciones por cromatografía líquida se realiza mediante RPLC. Antes de la invención de RPLC, las separaciones cromatográficas se realizaban utilizando una columna (o fase estacionaria) polar, en conjunto con una fase móvil menos polar. Estas separaciones ahora se denominan Cromatografía de fase normal (NPC, por su nombre en inglés *Normal-Phase Chromatography*) (Fanali et al., 2017).

La RPLC utiliza una columna analítica menos polar y una fase móvil más polar, las dos fases pueden considerarse intercambiadas o “invertidas” con respecto a la NPC. Al utilizar estos grados de polaridad en su fase estacionaria y fase móvil, una disminución en la polaridad de la fase móvil da como resultado una disminución en la retención de solutos. Los componentes de la muestra son eluidos en orden de polaridad, de manera tal que el componente más polar de la mezcla eluye primero (Andrea Weston & Phyllis R. Brown, 1997).

Como se mencionó anteriormente, la fase móvil en RPLC está constituida por un solvente polar (mezcla de agua y un modificador orgánico). El agua es un solvente débil y, para lograr la elución de la mayoría de los compuestos en RPLC, se mezcla con un solvente orgánico

miscible. Esto sirve para aumentar la fuerza del solvente de la fase móvil, los disolventes orgánicos más utilizados son Metanol, Acetonitrilo y Tetrahidrofurano (Fanali et al., 2017).

Con respecto a la fase estacionaria, en la RPLC se utilizan frecuentemente fases estacionarias unidas químicamente, en donde un grupo funcional está unido a la Sílice. El tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C₁₈ (grupo n-octadecilo) y en menor proporción C₈ (grupo n-octilo). Con respecto a estos sustituyentes (unidos a los grupos silanólicos), se observa en la RPLC que, mientras mayor longitud de cadena se presente, habrá una mayor retención de los analitos (Quattrochi y cols., 1992).

La posibilidad de separar simultáneamente compuestos neutros e iónicos, además del rápido equilibrio de la fase estacionaria tras cambios en la composición de la fase móvil, facilita el desarrollo rápido de métodos, y el uso de elución en gradiente. La relevancia de la RPLC en el área, es el resultado de algunas características ventajosas, como su amplia gama de aplicaciones que involucra analitos de distintos tamaños moleculares, polaridades y comportamiento iónico, lo que convierte a la RCLP en una técnica versátil (Fanali et al., 2017).

Además de lo mencionado, existen otras ventajas en el uso de este método de separación cromatográfico, como son: la existencia de una gran variedad de fases estacionarias para utilizar, el uso de fases móviles relativamente económicas, y la posibilidad de predecir el orden de elución de los componentes en función de su polaridad (Quattrochi y cols., 1992).

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar e implementar un método analítico capaz de identificar y cuantificar clorhexidina digluconato en Endogel, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con detector UV-Vis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I.** Realizar un diseño teórico del método analítico.
- II.** Realizar pruebas y correcciones al método diseñado teóricamente.
- III.** Validar el método analítico desarrollado.
- IV.** Elaborar la documentación relacionada con la validación del método analítico.

METODOLOGÍA

1. Realizar un diseño teórico del método analítico

La elaboración del diseño teórico de la metodología analítica se realizó en tres pasos:

- I.** La elección del método analítico, con la correspondiente técnica analítica y detector a utilizar.
- II.** Búsqueda bibliográfica enfocada en encontrar metodologías que utilicen las técnicas encontradas en el inciso anterior.
- III.** Elaboración de un documento preliminar, basado en la metodología analítica seleccionada, denotando sus características más importantes.

1.1. Elección del método analítico a utilizar

La selección del método analítico, y las herramientas de análisis instrumental que lo conforman, se basó en la información entregada en Moldoveanu y David (2017a), y en Skoog et al. (2008). Estas fuentes están especializadas en análisis instrumental y selección de métodos analíticos. Siguiendo las directrices brindadas por los textos mencionados, la elección del método estuvo basada en los siguientes antecedentes:

- a. **El propósito del análisis:** fue la primera información que se analizó. Esta información debe describir por qué se realiza el análisis, qué tipo de resultados se esperan del análisis y la utilidad de este. El propósito del análisis debe describir si el análisis está relacionado con un material, un proceso o ambos. Es importante saber si debe analizarse toda la muestra (todos los constituyentes son en este caso analitos), o solo una parte específica.
- b. **Información general sobre las muestras:** debe cubrir aspectos químicos de la muestra e información de propiedades físicas, así como cualquier otra información contingente. En un análisis químico deben considerarse dos partes de una muestra (los analitos y la matriz), los analitos son las especies moleculares o iónicas de interés en la muestra, y la matriz indica el resto de los componentes de la muestra.
- c. **Los componentes de la muestra y sus propiedades fisicoquímicas:** esta información se puede clasificar en propiedades analíticas o propiedades generales. Las propiedades o información analítica incluyen datos sobre la naturaleza química de los constituyentes, el rango de concentraciones de los analitos, etc. Las propiedades generales incluyen datos fisicoquímicos como volatilidad de analitos y

matriz, solubilidad en varios disolventes, carácter ácido-base, propiedades hidrofílicas-hidrofóbicas, reactividad, etc.

- d. La calidad y exactitud requerida de los resultados:** esta información se relaciona con el inciso a), ya que, por lo general es esperable que los resultados del análisis químico respondan a ciertas preguntas específicas relacionadas con el propósito del análisis. Para tener respuestas adecuadas, los resultados deben satisfacer requisitos específicos en cuanto a exactitud, precisión y número de muestras caracterizadas.
- e. Disponibilidad de instrumentación, experiencia en el laboratorio y financiamiento:** corresponde a factores externos al análisis pero que influyen en la factibilidad de su desarrollo. Es deseable que el laboratorio presente la experiencia analítica necesaria para llevar a cabo la implementación del método, así también se desea que el personal del laboratorio que lleve a cabo los análisis posea el conocimiento para ello.

El financiamiento es relevante cuando se necesita invertir en material analítico complementario (componentes de fases móviles, columnas cromatográficas, material volumétrico de laboratorio, cromatógrafos y detectores).

1.2. Búsqueda bibliográfica

Tras la elección de las herramientas analíticas a utilizar en la metodología que se desea desarrollar, se realizó una búsqueda bibliográfica en revistas digitales de química analítica que abordan temas de separaciones cromatográficas mediante HPLC. Además, se extrajo información desde la Farmacopea Estadounidense (USP).

1.3. Elaboración de documento preliminar

Una vez finalizada la búsqueda bibliográfica, se seleccionaron dos métodos analíticos para el desarrollo de este proyecto:

- a. **Método N°1:** Utilizó las directrices otorgadas por la USP para identificar y cuantificar clorhexidina digluconato en un gel tópico. En las Tablas 6 y 7 se presentan las condiciones instrumentales que utilizó este método para su ejecución. Además, se adjunta en la Tabla 8 las soluciones utilizadas en esta metodología.

Tabla 6. Condiciones instrumentales método N°1.

Equipo	: HPLC Agilent
Columna	: 4,6 mm × 25 cm; relleno L1 de 5 µm
Temperatura del horno	: 40°C
Detector	: UV
Velocidad de flujo	: 1.5 mL/min
Volumen Inyección	: 50 µL
Tiempo de corrida	: 21 min
Longitud de onda	: 239 nm
Fase móvil	: Gradiente (Tabla 7)

Tabla 7. Gradiente fase móvil método N°1.

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Flujo (ml/min)
0	100	0	1,5
9	100	0	1,5
10	45	55	1,5
15	45	55	1,5
16	100	0	1,5
21	100	0	1,5

Tabla 8. Soluciones método N°1.

Solución amortiguadora (pH 3,0)	Fosfato de sodio dihidrógeno (NaH ₂ PO ₄) + trietilamina + ácido fosfórico.
Solución A	Acetonitrilo y Solución amortiguadora (30:70)
Solución B	Acetonitrilo
Solución estándar	Clorhexidina acetato: 0,06 mg/ml
Solución muestra	Mezcla del contenido de 10 jeringas de Endogel, pesar 12 g de gel y llevar a 100 mL con solución A (clorhexidina digluconato: 0,06 mg/ml)

b. **Método N°2:** Utilizó las directrices entregadas por (Dubal et al., 2016), en las Tablas 9 y 10 se presentan las condiciones instrumentales que utilizó este método para su ejecución. Además, se adjuntan en la Tabla 11 las soluciones utilizadas en esta metodología.

Tabla 9. Condiciones instrumentales método N°2.

Equipo	: HPLC Agilent
Detector	: UV
Columna	: Luna C18 (Phenomenex, 250 x 4.6 mm, dp=5µm)
Pre – columna	: Security Guard C18 (Phenomenex 4 mm × 3 mm)
Temperatura Columna	: 25°C
Velocidad de Flujo	: 1,0 mL/min
Volumen de Inyección	: 20 µL
Tiempo de corrida	: 35 min
Longitud de Onda	: 239 nm
Fase móvil	: Gradiente (Tabla 10)

Tabla 10. Gradiente fase móvil método N°2.

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Flujo (ml/min)
0	85	15	1,0
2	85	15	1,0
5	80	20	1,0
9	75	25	1,0
10	75	25	1,0
12	70	30	1,0
15	70	30	1,0
20	70	30	1,0
21	85	15	1,0
30	85	15	1,0
35	85	15	1,0

Tabla 11. Soluciones método N°2.

Solución A fosfato de sodio 50 mM (pH 3,0)	Fosfato de sodio monobásico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) + trietilamina + ácido fosfórico.
Solución B	Acetonitrilo
Solución solvente	Solución A: Solución B (85:15)
Solución estándar	Clorhexidina acetato: 0,064 mg/ml
Solución muestra	Mezcla del contenido de 10 jeringas de Endogel, pesar 12,88 g de gel y llevar a 100 mL con solución solvente (clorhexidina digluconato: 0,064 mg/ml)

Con cada metodología se realizó un documento preliminar basado en el método analítico seleccionado y en él se precisó la información necesaria para su ejecución. Las características abordadas en el documento fueron las siguientes:

- a. Materiales y aparatos.
- b. Preparación de soluciones.
- c. Condiciones instrumentales.
- d. Procedimiento analítico.
- e. Cálculos.

2. Realizar pruebas y correcciones al método diseñado teóricamente

Antes de ejecutar el método y realizar la prueba de este, fue necesario definir la manera mediante la cual se evaluarían los resultados obtenidos de estas pruebas. Así, la primera

actividad estuvo enfocada en seleccionar los parámetros cromatográficos a evaluar y los valores para ser considerados aceptados. En segundo lugar, se efectuó la realización de las pruebas, de las cuales se adquirieron cromatogramas que permitieron la obtención de valores numéricos para los parámetros cromatográficos establecidos con anterioridad. Finalmente, se pudo realizar la evaluación de los valores obtenidos y, de esta manera, se llegó a una conclusión con respecto a que tan efectiva era la separación producida por la metodología analítica seleccionada.

2.1. Seleccionar parámetros cromatográficos y criterios numéricos de aceptación

Los cinco parámetros cromatográficos seleccionados para ser evaluados son los parámetros de medición más usual en el desarrollo de un método cromatográfico por HPLC. Estos parámetros tuvieron como objetivo brindar información sobre el desempeño y la calidad del proceso de separación cromatográfica. Para ser considerados como aprobados fue necesario fijar criterios numéricos esperados para cada uno de estos, tanto los parámetros como sus valores esperados (Tabla 12) fueron definidos por la bibliografía utilizada (Snyder et al., 2010); (Center for Drug Evaluation and Research & FDA, 1994).

Tabla 12. Parámetros cromatográficos y criterios numéricos de aceptación.

Parámetro cromatográfico	Valor esperado
Factor de retención o capacidad (k)	$2 \leq k \leq 20$
Factor de selectividad (α)	$1,1 \leq \alpha \leq 1,5$
Resolución (Rs)	$R_s > 2,0$
Número de platos teóricos (N)	$N \geq 2000$
Factor de tailing (TF)	$TF \leq 2,0$

2.2. Ejecución de pruebas

La prueba de la metodología seleccionada fue efectuada acorde al documento preliminar elaborado según lo señalado con anterioridad en esta sección “metodología”.

2.3. Obtener valores numéricos para los parámetros cromatográficos establecidos

La obtención de resultados desde los cromatogramas se realizó mediante el software *Empower 3*, por el cual se efectúa la operación de los cromatógrafos. Este software almacena la información de las pruebas realizadas y, de esta forma, se obtuvieron los valores correspondientes a cada parámetro de manera automatizada.

2.4. Evaluación valores obtenidos

La evaluación de los resultados obtenidos se realizó según los mismos criterios de aceptación para cada parámetro señalado en la tabla 12.

3. Validar el método analítico desarrollado

Para validar el método analítico, lo primero que se hizo fue establecer los parámetros de validación y sus correspondientes criterios de aceptación. Luego de establecidos los criterios, se acordaron los procedimientos a través de los cuales se evaluaron los parámetros establecidos. Con la información que se recaudó, se elaboró el protocolo de validación y, seguido de esto, se realizó la validación como tal.

Por medio de la experiencia práctica que englobó la validación de la metodología analítica, se obtuvieron resultados para cada parámetro evaluado y, finalmente, se determinó si los resultados cumplieron, o no, frente a los criterios de aceptación establecidos.

3.1. Establecer los parámetros de validación y sus correspondientes criterios de aceptación

Los parámetros analíticos que se evalúan en una validación de una metodología analítica dependen del tipo de ensayo o procedimiento analítico que se busque validar. Para este caso, la metodología analítica tuvo como objetivo la identificación y valoración (o cuantificación) de clorhexidina digluconato, que es un analito específico y definido dentro de la formulación.

La selección de los parámetros analíticos se realizó según el tipo de ensayo a realizar (Tabla 4). Los parámetros que se evaluaron en esta validación se encuentran especificados en la Tabla 13, en conjunto con los criterios de aceptación que se utilizaron para cada uno de estos parámetros. Dichos criterios se encuentran en concordancia con lo especificado en FDA (FDA, 2020).

Tabla 13. Parámetros de validación y criterios de aceptación utilizados en la validación de metodología analítica de identificación y cuantificación de un analito.

Parámetros de validación	Criterio de aceptación
Prueba de idoneidad del sistema (SST)	$N \geq 2000$ $TF \leq 2,0$ $RSD\ tR (\%) \leq 1,0\%$ $RSD\ \text{área} (\%) \leq 1,0\%$
Especificidad	No hay co-elución de los peak en el solvente ni placebo, con el tiempo de retención del estándar de clorhexidina.
Linealidad	Regresión $(r) \geq 0,99$ Intercepto $\leq 3\%$

	(del área del peak al nivel del 100%)
Exactitud	El % de recuperación de la muestra individual debe estar entre el 98 % -102 % en cada nivel investigado.
Precisión (repetibilidad)	RSD \leq 1,5 % (repetibilidad de seis muestras)
Precisión intermedia	RSD \leq 2,0% (repetibilidad de doce muestras)
Rango	Si los resultados de linealidad, precisión y exactitud cumplen el criterio de aceptación, el rango de concentración de la muestra se establece entre el 80 y 120 % de la concentración objetivo.
Estabilidad	El contenido de clorhexidina debe estar entre 98% - 102%
Robustez	Los resultados obtenidos, para cada parámetro, deben estar dentro del intervalo de confianza (error aleatorio), para considerar que el parámetro no afecta a los resultados F cal < F crítico Para concluir que no existen diferencias significativas entre las tres variables.

3.2. Establecer los procedimientos a través de los cuales se evaluaron los parámetros antes establecidos

El Laboratorio Synthon posee un procedimiento operativo estándar que aborda la validación de métodos analíticos y se utiliza para determinar los valores correspondientes a cada parámetro analítico estudiado en una validación. Sumado esto, se utilizaron las directrices proporcionadas por el ICH que abordan la metodología de las validaciones de métodos analíticos(ICH, 2005a) (Tabla 14).

Tabla 14. Metodología utilizada en la evaluación de los parámetros analíticos estudiados en la validación de métodos analíticos.

Parámetros analíticos de validación	Metodología
Prueba de idoneidad del sistema (SST)	Se realizó a través de cinco inyecciones de preparación estándar, según la secuencia propuesta en el protocolo de validación.
Especificidad	Se realizó a través de la comparación de los resultados (tiempo de retención) del análisis de solución solvente, solución placebo (con y sin lidocaina), solución estándar de clorhexidina, solución estándar de lidocaina, y solución de excipiente (metilparabeno, propilparabeno y methocel).
Linealidad	Se realizó mediante el análisis de cinco preparaciones de concentraciones diferentes de estándar de clorhexidina (80%, 90%,100%, 110% y 120%) inyectadas en triplicado.
Exactitud	Se realizó mediante el análisis de tres preparaciones con

	concentraciones diferentes de estándar de clorhexidina (80%, 100% y 120%), en conjunto con una concentración conocida de placebo, cada preparación se inyectó por triplicado.
Precisión (repetibilidad)	Se realizó mediante la determinación del contenido de clorhexidina en seis preparaciones muestra independientes con una concentración del 100%. Esta prueba se realizó por la misma analista.
Precisión intermedia	Se realizó mediante la ejecución de un segundo estudio de repetibilidad, efectuado por una analista diferente.
Rango	Se realizó mediante el análisis de los resultados obtenidos para linealidad, precisión y exactitud.
Estabilidad	Se realizó mediante la exposición de la preparación estándar de clorhexidina acetato y la preparación muestra por 8 días a tres distintas condiciones: temperatura ambiente/Luz, temperatura ambiente/oscuridad y refrigerado (2-8°C)/oscuridad.
Robustez	Se realizó mediante la evaluación de la preparación estándar de clorhexidina frente a la variación de tres condiciones cromatográficas: $\pm 0,2$ mL/min flujo fase móvil, $\pm 5^{\circ}\text{C}$ temperatura de la columna y $\pm 2\text{nm}$ longitud de onda detector.

3.3. Elaborar el protocolo de validación

El Laboratorio Synthon no cuenta con un procedimiento operativo estándar específico para la elaboración de protocolos de validación. Por este motivo, la manufactura de este documento se basó en las directrices proporcionadas en el procedimiento operativo estándar

interno del Laboratorio Synthron (2021) que aborda la validación de métodos analíticos, en conjunto con documentación elaborada por la FDA (FDA, 2020), ISP (Sandoval, 2010), y Asociación de Farmacéuticos de España (AEFI, 2001). Los contenidos y componentes principales presentados en el protocolo de validación (Anexo 1) fueron los siguientes:

- a. Introducción.
- b. Objetivo de la validación.
- c. Parámetros de la validación.
- d. Materiales y equipos utilizados.
- e. Condiciones instrumentales.
- f. Preparación de soluciones.
- g. Procedimiento analítico específico para cada parámetro analítico.

3.4. Realizar la validación y obtener resultados para cada parámetro evaluado

Se realizó la validación del método analítico según lo detallado en el protocolo de validación y, mediante el uso del software de operación del cromatógrafo utilizado, se obtuvieron los resultados para cada prueba realizada, con excepción del parámetro analítico “robustez” para el cual se utilizó la herramienta Microsoft Excel ya que se necesitó de un análisis estadístico.

3.5. Determinar si los resultados cumplen, o no, frente a los criterios establecidos

La determinación del cumplimiento de cada parámetro analítico evaluado se realizó a través de la comparación entre los datos obtenidos mediante la validación y los criterios de aceptación establecidos en la Tabla 13 para cada uno de estos.

4. Elaborar la documentación relacionada con la validación del método analítico

Las últimas actividades realizadas en este proyecto fueron la elaboración de la documentación faltante relacionada con la validación del método analítico, tal como se especificó en la Figura 3, el último documento relacionado a la validación de un método analítico es el reporte de validación. Además, en el Laboratorio Synthon, al finalizar la validación, se elabora y emite el documento final que contiene el método que acaba de ser validado, por ende, de manera simultánea se realizó la elaboración del reporte de validación y la elaboración del documento final con el método analítico validado.

4.1. Elaboración del reporte de validación

El Laboratorio Synthon no cuenta con un procedimiento operativo estándar específico para la elaboración de reportes de validación, por este motivo la manufactura de este documento se basó en las directrices proporcionadas el procedimiento operativo estándar interno del Laboratorio Synthon (Carla Muñoz C, s. f.), que aborda la validación de métodos analíticos en conjunto con documentación elaborada por la FDA (FDA, 2020), el ISP (Sandoval, 2010), y la Asociación de Farmacéuticos de España (AEFI, 2001). Los contenidos y componentes principales presentados en el reporte de validación (Anexo 2) fueron los siguientes:

- a. Introducción.
- b. Propósito de validación.
- c. Resumen de resultados.
- d. Referencias.
- e. Materiales y equipos utilizados.

- f. Descripción del sistema.
- g. Preparación de soluciones.
- h. Parámetros por evaluar, y resultados detallados.
- i. Conclusión.
- j. Desviaciones.

4.2. Elaboración del documento final con el método analítico validado

Este documento final (que presenta el método analítico validado) se le reconoce por el código interno asignado por parte del Laboratorio Synthón. Tanto el diseño como la información contenida en este se definió por parte del laboratorio, siguiendo sus directrices. Los contenidos y componentes principales presentados en el documento contenedor del método analítico (Anexo 3) fueron los siguientes:

- a. Introducción.
- b. Materiales y aparatos o equipos necesarios para su ejecución.
- c. Preparación de soluciones.
- d. Condiciones instrumentales.
- e. Procedimiento analítico.
- f. Información relacionada a la robustez del método.
- g. Cálculos asociados al propósito del método.
- h. Cromatogramas relevantes para la identificación del principio activo.
- i. Referencias.

RESULTADOS

El inicio de este proyecto se relacionó con la apertura de una acción correctiva por parte del Departamento de Control de Calidad del Laboratorio Synthon Chile. Cuando se realizó dicha acción, se propuso una solución al problema a través de la implementación de una metodología analítica basada en el método analítico encontrado en la USP (Método N°1). Esta metodología fue ejecutada por encargados del Departamento ya mencionado, con el fin de observar los resultados preliminares entregados por esta.

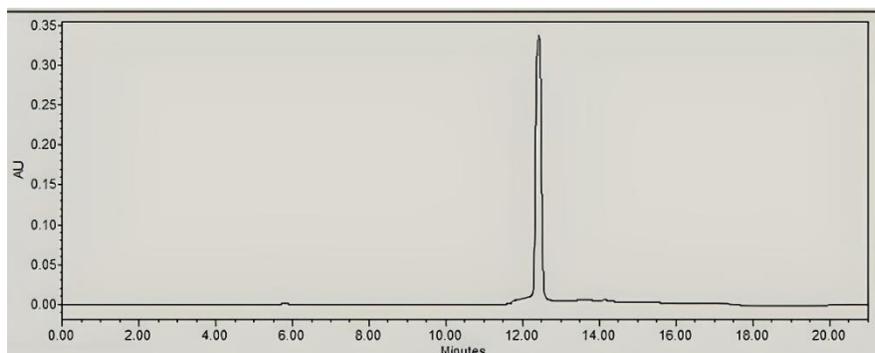
Luego de esto, los encargados de realizar las pruebas informaron verbalmente a la jefatura de ATG sobre los favorables resultados obtenidos a través de la metodología sugerida. Por esta razón, el laboratorio tomó la decisión de elaborar el protocolo de validación (Anexo 1), basado en el Método N°1.

1. Resultados Método N°1

Todos los resultados presentados en esta sección se obtuvieron mediante la ejecución de la metodología “Método N°1” en el presente documento. La información principal de este se encuentra en las Tablas 6, 7 y 8. Este método se encuentra con mayor detalle en el Anexo N°1 que corresponde al protocolo de validación.

Los primeros resultados obtenidos fueron de la prueba de idoneidad del sistema, en donde se realizaron inyecciones de solvente (Figura 9) y de solución estándar (Figura 10).

Figura 9. Cromatograma Solución Solvente.

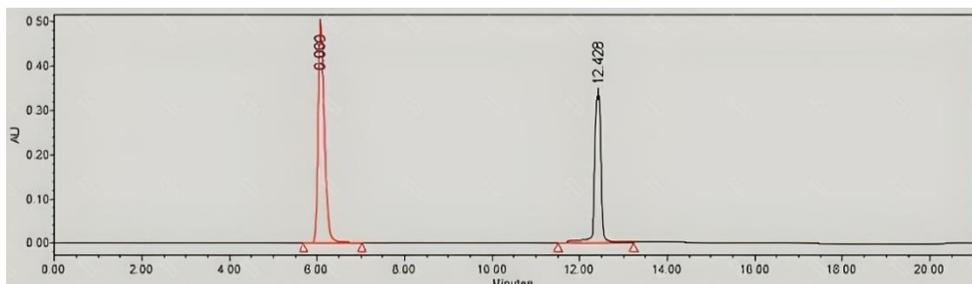


Nota: Obtenido desde software Empower 3.

Con respecto a la Figura 9, esta corresponde al cromatograma obtenido de la inyección de solución solvente, en donde se aprecia un único *peak* cromatográfico en los 12,5 minutos aproximadamente.

Luego, con la inyección de solución estándar se obtuvo el cromatograma correspondiente a la Figura 10, la información cromatográfica relacionada con esta figura se presenta en las Tablas 15 y 16.

Figura 10. Cromatograma Solución Estándar.



Nota: Obtenido desde software Empower 3.

Tabla 15. Datos cromatograma solución estándar (Figura 10).

Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Altura (μV)	Ancho (seg)
6,080	4931112	490986	79,50
12,428	3634378	337605	104,50

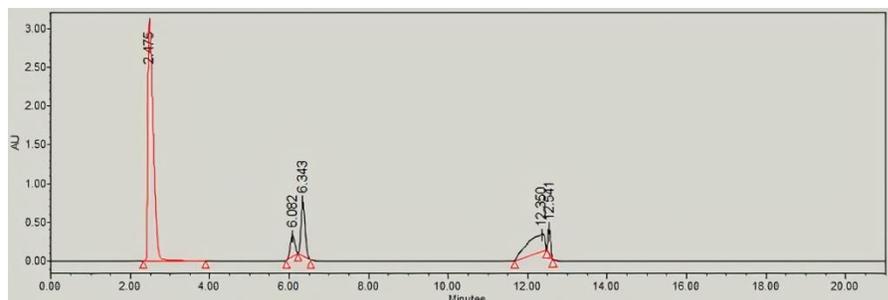
Los resultados obtenidos mediante la ejecución del “Método N°1” para la solución estándar de clorhexidina acetato evidenciaron un tiempo de retención para la clorhexidina de 6,08 minutos (Figura 10 y Tabla 15).

Tabla 16. Parámetros cromatográficos calculados para solución estándar (Figura 10).

Tiempo de retención (min)	F. de capacidad (k)	F. de selectividad (α)	Resolución (R_s)	TF	Platos teóricos (N)
6,080	1,93	-	-	1,4	8801
12,428	4,98	2,6	-	0,9	45242

Luego de los resultados obtenidos con las inyecciones anteriores que forman parte del SST, se inyectó solución muestra a modo de prueba. En la Figura 11 se presenta el cromatograma obtenido de la inyección de solución muestra de Endogel, en donde se observan cinco picos cromatográficos, cuya información se encuentra en las Tablas 17 y 18.

Figura 11. Cromatograma Solución Muestra.



Nota: Obtenido desde software Empower 3.

En el cromatograma de la muestra de Endogel, obtenido mediante este mismo método, se observa que existen dos picos cromatográficos de elución muy cercana al tiempo de retención del estándar de referencia. Los parámetros cromatográficos de estos tres picos (estándar y dos peaks muestra) son comparados con los criterios de aceptación establecidos (Tabla 12) en la Tabla 19, en donde se observa el no cumplimiento de estos

Tabla 17. Datos cromatográficos solución muestra (Figura 11).

Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Altura (μV)	Ancho (seg)
2,475	29901110	3057598	94,5
6,082	2121358	272861	17,0
6,343	5252015	709301	19,5
12,350	7468947	222325	48,5
12,541	1443448	335402	9,0

Tabla 18. Parámetros cromatográficos calculados para solución muestra (Figura 11).

Tiempo de retención (min)	F. de capacidad (k)	F. de selectividad (α)	Resolución (Rs)	TF	Platos teóricos (N)
2,475	0,19			2,2	1473
6,082	1,93	10,1	15,2	1,0	12931
6,343	2,05	1,1	1,2	1,2	16206
12,350	4,95	2,4	10,2	0,6	3907
12,541	5,04	1,0	0,4	1,3	178039

De los parámetros cromatográficos calculados para solución muestra, se consideraron los peaks con tiempos de retención dentro del siguiente rango:

$$t_R = 6,080 \text{ min} \pm 0,5 \text{ min}$$

En la Tabla 19 se expone la comparación y cumplimiento (según sea el caso), de los valores obtenidos para los parámetros cromatográfico, tanto de la inyección de solución estándar (Tabla 16) como también los provenientes de la inyección de solución muestra (Tabla 18).

La comparación de los valores se realizó frente a los criterios de aceptación (Tabla 12) establecidos en la metodología. Esta comparación comprende únicamente los *peaks* cromatográficos dentro del rango acordado.

Tabla 19. Comparación y cumplimiento de los parámetros cromatográficos evaluados en solución muestra (Figura 11).

Tiempo de retención (min)	F. de capacidad (k)	F. de selectividad (α)	Resolución (R_s)	TF	Platos teóricos (N)
6,080 (Estándar)	1,93	-	-	1,4	8801
6,082 (<i>peak 1</i>)	1,93	-	-	1,0	12931
6,343 (<i>peak 2</i>)	2,05	1,1	1,2	1,2	16206
Criterios de aceptación	$2 \leq k \leq 20$	$1,1 \leq \alpha \leq 1,5$	$R_s > 2,0$	$TF \leq 2,0$	$N \geq 2000$

De la comparación realizada se evaluó el cumplimiento de los valores obtenidos, en la Tabla 19 se identificaron los resultados según 3 categorías, y diferentes colores, de la siguiente manera:

- a. Valor cumple con el criterio de aceptación → Verde
- b. Valor en límite de aceptación → Amarillo
- c. Valor no cumple con el criterio de aceptación → Rojo

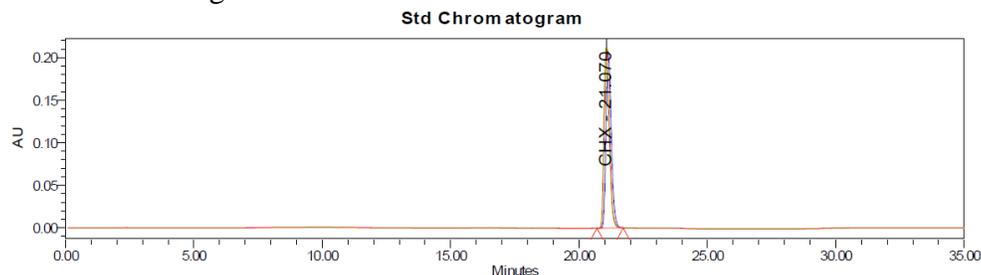
Como se ve en el cromatograma de la Figura 11 y los parámetros cromatográficos de la Tabla 18, no se logra una separación eficiente ya que existe la presencia de dos *peaks* cromatográficos contiguos con una resolución deficiente. Además, con un valor de factor de selectividad (α) en el límite inferior del rango aceptado, por lo que es posible afirmar que este método no es óptimo para llevar a cabo la separación y la cuantificación del analito de interés.

2. Resultados Método N°2

Todos los resultados presentados en esta sección se obtuvieron mediante la ejecución de la metodología “Método N°2” en el presente documento. La información principal de este se encuentra en las Tablas 9, 10 y 11, que a su vez se encuentran con mayor detalle en el Anexo N°2 que corresponde al reporte de validación.

En este caso, se comenzó realizando (a modo de prueba) una inyección de solución estándar de clorhexidina acetato. El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 12, mientras que en la Tabla 20 se expusieron los valores obtenidos para los datos y parámetros cromatográficos.

Figura 12. Cromatograma solución estándar clorhexidina.



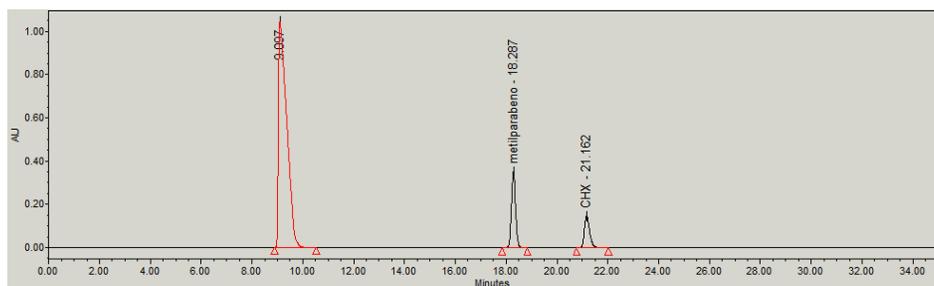
Nota: Obtenido desde software Empower 3.

Tabla 20. Datos y parámetros cromatográficos solución estándar clorhexidina.

Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Ancho (seg)	F. de capacidad (k)	TF	Platos teóricos (N)
21,070	3028988	61,50	9,14	1,3	50099

Luego, con el mismo objetivo, se realizó una inyección de solución muestra de Endogel; en la Figura 13 se presenta el cromatograma obtenido, en donde se evidencian 3 *peaks* cromatográficos cuya información se detalla en las Tablas 21 y 22.

Figura 13. Cromatograma solución muestra.



Nota: Obtenido desde software Empower 3.

Tabla 21. Datos cromatograma solución muestra (Figura 13).

Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Altura (μV)	Ancho (seg)
9,097	23762238	1044243	94,5
18,287	3952018	351302	60,0
21,162	2104874	147878	75,0

La solución estándar de clorhexidina acetato presentó un tiempo de retención de 21,07 minutos (Figura 12 y Tabla 20). En el cromatograma de la muestra del estudio empleando este método se observan tres *peaks* bien definidos. En fase reversa, la elución de cada uno de estos analitos está dada por un orden decreciente de polaridad, es decir que, para nuestro caso el primer analito observado, corresponde a la lidocaína, seguido del metilparabeno y, por último, la clorhexidina, siendo este el analito menos polar.

Tabla 22. Parámetros cromatográficos calculados para solución muestra (Figura 13).

Tiempo de retención (min)	F. de capacidad (k)	F. de selectividad (α)	Resolución (R_s)	TF	Platos teóricos (N)
9,097	3,38	-	-	3,2	2934
18,287	7,80	2,31	19,9	1,1	60714
21,162	9,19	1,18	8,6	1,3	51651

De los parámetros cromatográficos calculados para solución muestra, se consideró únicamente el *peak* más cercano al tiempo de retención del estándar ($t_R = 21,07$ min). En la Tabla 23 se expone la comparación y cumplimiento (según sea el caso), de los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos de la solución estándar (Tabla 20) y los provenientes del *peak* considerado de la inyección de solución muestra (Tabla 22). La comparación de los valores se realizó frente a los criterios de aceptación (Tabla 12) establecidos en la metodología.

Tabla 23. Comparación y cumplimiento de los parámetros cromatográficos evaluados en solución muestra (Figura 13).

Tiempo de retención (min)	F. de capacidad (k)	F. de selectividad (α)	Resolución (R_s)	TF	Platos teóricos (N)
21,070 (Estándar)	9,14	-	-	1,3	50099
21,162	9,19	1,18	8,6	1,3	51651
Criterios de aceptación	$2 \leq k \leq 20$	$1,1 \leq \alpha \leq 1,5$	$R_s > 2,0$	$TF \leq 2,0$	$N \geq 2000$

Para la evaluación del cumplimiento de los valores obtenidos; en la Tabla 23 se utilizó la misma asociación de resultados, según 3 categorías (y sus respectivos colores), presentada en los resultados de la metodología anteriormente expuesta.

Los valores para los parámetros cromatográficos expuestos en la Tabla 22, y posteriormente comparados (Tabla 23) contra los criterios establecidos, indican que en este caso la separación fue más eficiente en comparación al “Método N°1”. Lo anterior se ve reflejado en el cumplimiento de los criterios establecidos de la Tabla 12, demostrando valores altos en la resolución y factor de selectividad. En conjunto con el cromatograma presentado, indica una buena separación para el análisis de la muestra de Endogel.

3. Validación Método N°2

La validación del Método N°2 se realizó según la metodología expuesta, con anterioridad en la Tabla 14, que a su vez se encuentra detallada en el protocolo de validación (Anexo 1).

Los resultados de cada prueba realizada dentro de la validación del método N°2 se encuentran en el reporte de validación (Anexo 2). En la Tabla 24, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la validación de la metodología analítica N°2.

Tabla 24. Resumen de resultados obtenidos en la validación del método N°2

Parámetros de Validación	Resultado
System Suitability Test	RSD Área (%) = 0,1% RSD tr = 0,1% N = 44307 T= 1,4
Estándar Check	100%
Especificidad	Mediante evaluación de especificidad se observa que las señales de preparación solvente y placebo no interfieren con la señal del peak de clorhexidina acetato.
Linealidad	Regresión (r) = 0,99 Intercepto= 59447 $\mu\text{V}\cdot\text{s} \leq 90005$ (3% de 3000154 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
Exactitud	Resultados de Recuperación promedio (tres preparaciones) de exactitud por nivel: 80% = 98 % 100% = 99 % 120% = 98 %
Precisión (Repetibilidad)	RSD (%): 0,7 %
Precisión Intermedia	RSD (%): 0,8 %
Estabilidad	Preparación Estándar es estable 4 días en condiciones de ambiente/oscuridad y 8 días en condiciones ambiente/luz y refrigerado/oscuridad. (98% - 102%) Preparación Muestra es estable 8 días en condiciones de ambiente/luz,

	ambiente/oscuridad y refrigerado/oscuridad. (98% - 102%)
Robustez	
Flujo 0.8 mL/min Flujo 1.2 mL/min	F calculado = 185509,93 F crítico= 3,89
Temperatura de columna 20°C Temperatura de columna 30°C	F calculado = 1008,63 F crítico = 3,89
Longitud de onda 237 nm Longitud de onda 241 nm	F calculado = 2558,05 F crítico = 3,89

Los parámetros de validación estudiados para el “Método N°2” (detallados en el reporte de validación, Anexo N°2) fueron: System Suitability, standard check, especificidad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia, exactitud se cumple con todos los criterios de aceptación. Así también se evaluó, el estudio de estabilidad de las preparaciones y la robustez del método. Se ve que los resultados del *Standard Check* están en el rango del 100% por lo tanto cumplen, por encontrarse dentro del rango establecido como criterio de aceptación (99-101%). Con respecto a los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método, observando las figuras 1 a 8, se evidencia que, en los cromatogramas tanto de las muestras, como de los placebos y solventes, las condiciones establecidas dan señal de una separación confiable y específica donde los otros componentes de la muestra no son detectados ni interfieren en el pico de la clorhexidina.

En cuanto a la linealidad de la curva de calibración obtenida para este estudio, se presenta un valor de coeficiente de variación de Pearson (r) cercano a la unidad, lo que indica una dependencia lineal entre las dos variables. Sumado a lo anterior, al observar la ecuación de la recta obtenida, el valor para el intercepto cumple con el criterio de ser $\leq 3\%$ del área obtenida para la medición de la solución empleada al 100%.

Los análisis de 6 y 12 muestras permitieron hacer el estudio de la precisión, cumpliendo así con una desviación estándar para el criterio de aceptación afirmando la precisión del método. También los análisis de estabilidad de la solución patrón de clorhexidina acetato, frente a temperatura y presencia de luz y se observó que no existe una degradación térmica ni fotoquímica del compuesto si se almacena durante 4 días en condiciones de ambiente/oscuridad y 8 días en condiciones de ambiente/luz y refrigerado/oscuridad. Mientras que la muestra resultó ser estable por 8 días en condiciones de ambiente/luz, ambiente/oscuridad y refrigerado/oscuridad, esto se evaluó comparando el *peak* cromatográfico de las soluciones en las condiciones anteriores.

Por último, se evaluó la robustez del método, comparando los valores obtenidos para la prueba de idoneidad del sistema con las condiciones cromatográficas establecidas desde un comienzo, versus los valores obtenidos para el SST con variaciones en una de las tres condiciones cromatográficas definidas: velocidad de flujo, temperatura de columna y longitud de onda del detector. Para este análisis se esperaba que los datos obtenidos para cada parámetro estuviesen dentro del intervalo de confianza lo cual no sucedió, por lo tanto, se estableció que

el método no puede ser sometido a variaciones tanto en la configuración del cromatógrafo como del detector.

DISCUSIÓN

El objetivo general de este proyecto fue desarrollar e implementar un método analítico capaz de identificar y cuantificar clorhexidina digluconato en Endogel utilizando HPLC con detector UV-Vis, para lo cual se probaron dos métodos analíticos.

Comparando los dos métodos empleados, ambos utilizaron columnas de las mismas dimensiones y con la misma fase estacionaria (octadecilsilano). Sin embargo, se presta para debatir el efecto de la temperatura, ya que el “Método N°1” con una temperatura de análisis de 40 °C, presentó menor tiempo de retención y no presentó una buena separación. En comparación con el “Método N°2” que, empleando una temperatura de 25 °C, tuvo una mejor resolución en sus picos. Por lo tanto, es válido considerar que no siempre el efecto de la temperatura está asociado a mejorar la eficiencia y separación, y debe ser un punto crucial en la cuantificación de este analito.

Otro aspecto para considerar es la fase móvil, el “Método N°1” presenta una proporción (70:30) de solución buffer:acetonitrilo, mientras que, en el “Método N°2” la proporción es (85:15) para el buffer y el acetonitrilo respectivamente. Por ende, el acetonitrilo y el buffer tienen un efecto significativo a la hora de mejorar la polaridad de dicha fase móvil, mejorando así el reparto entre ambas fases estacionaria-móvil y aumentando los factores de capacidad.

Se entiende, entonces, que el “Método N°2” es el más adecuado para la determinación del analito de interés, por esto, la validación de este método se realizó teniendo en cuenta los parámetros especificados en la Tabla 14, que también se encuentran detallados en el protocolo de validación (Anexo N°1).

A modo de discusión, se buscó comparar los resultados de este trabajo frente a los datos reportados por Dubal et al (2016), dicha comparación se encuentra en la tabla 25. Se observa que emplearon condiciones distintas desde la columna, donde usaron una más pequeña con 150 mm de longitud y con el mismo diámetro interno y tamaño de partícula con las que se encontraron los resultados expuestos anteriormente. Asimismo, en la fase estacionaria, en la que ellos emplearon una de C8 (octilsilano), encontraron resultados satisfactorios. Para la fase móvil, se utilizó una elución en gradiente de una solución amortiguadora de fosfato de sodio, en conjunto con acetonitrilo, lo cual es un punto en común con el método obtenido en este proyecto. El rango ácido de pH es importante ya que tanto los resultados de ellos obtuvieron, como los presentados aquí, presentaron buena resolución, estabilidad, un valor alto para el número de platos teóricos y una buena forma de pico. La presencia del acetonitrilo se escogió para disminuir los largos tiempos de retención.

Tabla 25. Tabla comparativa: Dubal et. al (2016) v/s “Método N°2”

	Dubal et. al. (2016)	Método N°2
Columna	Wakosil II C8 RS	Luna C18
Dimensiones columna	150 mm x 4,6 mm i.d, 5 um dp	250 mm x 4,6 mm i.d, 5 um dp

Velocidad de flujo	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Volumen de inyección	20 uL	20 uL
Fase móvil	Acetonitrilo - Tampón fosfato sódico 50 mM pH 3,0	Acetonitrilo - Tampón fosfato sódico 50 mM pH 3,0
Elución	Gradiente	Gradiente
Evaluación sst	TF < 2,0 N > 40000 RSD < 2,0%	TF ≤ 2,0 N > 2000 RSD t_r ≤ 1,0% RSD área ≤ 1,0%

La validez del sistema, en el estudio de Dubal et al (2016), se realizó empleando la inyección de 5 réplicas del estándar donde los parámetros que se buscaban era un TF y RSD con un valor < 2 y valores para los platos teóricos no menores a 40000 para el gluconato de clorhexidina. Los resultados obtenidos para el SST en la validación del método N°2, cumplen los criterios expuestos en el documento de Dubal et. al. (2016) como los definidos en el protocolo de validación del presente proyecto.

Para la especificidad, ellos también emplearon un placebo y no encontraron interferencias ni coeluciones entre los picos. En cuanto a los estudios de precisión y repetibilidad ellos inyectaron 6 patrones observando que el %RSD no fuera mayor al 2% cosa que estuvo presente en ambos resultados afirmando así la viabilidad y precisión del método.

El análisis de clorhexidina en productos comerciales no resulta nuevo y no es exclusivamente analizado por HPLC. El reporte realizado por Masquio et al. (2010), muestra que desde la década de los 70' se han realizado estudios a este fármaco con técnicas como las

volumétricas empleando soluciones acuosas 0,1M de ácido perclórico. Sin embargo, estos métodos no resultan tan validos ni estadísticamente completos para los diferentes entes reguladores y farmacopeas en Europa y Estados Unidos. Además de que estas técnicas implican un mayor gasto de reactivo en comparación con los pequeños volúmenes de inyección en cromatografía.

Como ya se ha tratado en los productos farmacéuticos, HPLC es el método más usado para analizar este antiséptico, pero también se han reportado resultados empleando extracción en fase solida con espectrometría UV (Bonazzi et al., 1995), cromatografía de gases (Miribel et al., 1983) y electroforesis capilar (Abad-Villar et al., 2006).

En el compendio que realiza Masquio et al. (2010), se observa que los métodos empleando HPLC acoplado a un detector UV, por lo general usaron columnas C8 y C18, y un rango de longitud de onda de 239-270 nm. No ha existido gran diferencia en el empleo de una fase móvil, por lo general se emplea una mezcla de acetonitrilo y un buffer fosfato a pH 3.0-3.5. Sin embargo, algunos reportes usan una fase móvil como acetonitrilo acidificado con ácido sulfúrico, otros emplean mezclas de metanol o propanol con buffer fosfato, todo esto dependiendo la muestra en que se quiera cuantificar la clorhexidina sea un ungüento veterinario o soluciones oftalmológicas.

Para finalizar, en la tabla 26 se realiza una comparación con los datos reportados por Havlikova et al. (2007), donde se usaron condiciones similares a las aquí empleadas como una columna C18 con las mismas dimensiones, una fase móvil de acetonitrilo y una solución buffer a pH 3.0.

Tabla 26. Tabla comparativa: Havlikova et. al. (2007) v/s “Método N°2”

	Havlikova (2007)	Método N°2
Columna	Supelco Discovery C18	Columna C18
Dimensiones columna	250 mm x 4,6 mm i.d, 5 um dp	250 mm x 4,6 mm i.d, 5 um dp
Velocidad de flujo	0,6 mL/min	1,0 mL/min
Fase móvil	Acetonitrilo y solución buffer fosfato de sodio monobásico 0,08 M 35:65 (v/v), llevada a pH 3,0	Acetonitrilo - Tampón fosfato sódico 50 mM pH 3,0
Elución	Isocrático	Gradiente

Se encuentra como diferencia la elución de la fase móvil, ya que en el documento de Havlikova et al. (2007), se presenta un método que utiliza elución isocrática, mientras que el método N°2 emplea una elución en gradiente. Por otro lado, los criterios de aceptación que emplearon en la validación del método fueron ligeramente disímiles a los expuestos en el protocolo de validación (Anexo N°2). Los valores de RSD < 1,0 para estudios de repetibilidad y para la precisión de la validez del método RSD <5,0. También un número de platos para la clorhexidina esperado > 2000. Según vemos, todos nuestros resultados se encuentran dentro del rango de este reporte, con valores de 40000 en los platos teóricos para el analito de interés y con RSD menores al 1,0 en todos los casos, eso habla de la eficiencia del método aplicado en el presente documento, la validez y viabilidad que presenta.

CONCLUSIÓN

Durante el desarrollo de este proyecto, se evaluaron dos métodos analíticos basados en búsqueda bibliográfica y cuyo objetivo fue implementar un método analítico para cuantificar e identificar clorhexidina digluconato en Endogel. Esto con el fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos establecidos para un medicamento y una regulación en específico. El método más adecuado estuvo basado en el documento de Dubal et al. (2016), donde empleando un montaje de HPLC utilizando fase reversa y acoplado a un detector UV-Vis, se encontró que es válido para todos los parámetros y criterios de aceptación establecidos.

El método analítico propuesto fue validado mediante análisis estadístico de los resultados de los ensayos realizados en muestras controladas, que han posibilitado el estudio de cada una de las características de desempeño del método seleccionadas, como: prueba de idoneidad del sistema, selectividad, linealidad, precisión, exactitud, estabilidad y robustez.

El método desarrollado y validado posibilitó la correcta cuantificación e identificación de forma válida de la clorhexidina digluconato, así como la identificación de la lidocaína y excipientes presentes en el producto farmacéutico estudiado.

Con los resultados obtenidos, se puede plantear como una proyección del trabajo realizado, que el método desarrollado es viable para emplearse en el control de calidad de este tipo de fármaco y así entregar un producto con un alto estándar de calidad, seguridad y eficacia a los pacientes y consumidores, así como para asegurar que el medicamento cumpla con los niveles requeridos y con normativas tanto nacionales como internacionales.

BIBLIOGRAFÍA

AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria) (2001). Validación de Métodos Analíticos. Ed. A.E.F.I. Madrid, E. p.67.

Abad-Villar, E. M., Etter, S. F., Thiel, M. A., & Hauser, P. C. (2006). Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Analytica Chimica Acta*, 561(1), 133–137.

American Society for Testing and Materiales. (2015). ASTM D1193-99e1. Standard Specification for Reagent Water, PA: ASTM International.

Bonazzi, D., Andrisano, V., Gatti, R., & Cavrini, V. (1995). Analysis of pharmaceutical creams: A useful approach based on solid-phase extraction (SPE) and UV spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(11), (p. 1321–1329). [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(95\)01536-T](https://doi.org/10.1016/0731-7085(95)01536-T)

Burgess, C. (2017). Chapter 1—The Basis for Good Spectrophotometric UV–Visible Measurements. En O. Thomas & C. Burgess (Eds.), *UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater* (2^{da} ed., p. 1–35). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63897-7.00001-9>

Carla Muñoz C. (s. f.). *Procedimiento Operativo Estándar: Validación de Métodos Analíticos*. Synthón Chile.

Cazes, J. (2001). Encyclopedia of Chromatography. CRC Press.

Center for Drug Evaluation and Research. (s.f.). Pharmaceutical Quality Resources. FDA. Visitado : 23 diciembre 2021. <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/pharmaceutical-quality-resources>

ChemPoint. (s. f.). METHOCEL™ Cellulose Ethers. Visitado: 1 septiembre 2022. <https://www.chempoint.com/en-emea/products/dupont/methocel-water-soluble-cellulose-ethers>

Decreto Supremo 3 de 2010 [Ministerio de Salud de Chile]. Aprueba reglamento del sistema nacional de control de los productos farmacéuticos de uso humano. 25 enero 2010.

Dolan, J. W., & Snyder, L. R. (2013). Chapter 12—Theory and Practice of Gradient Elution Liquid Chromatography. En S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. Schoenmakers, & D. Lloyd (Eds.), Liquid Chromatography (p. 269–282). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415807-8.00012-2>

Douglas A., Skoog, F., Holler, J., & Crouch S. R. (2008). Principios de análisis instrumental (6^{ta} ed.). CENGAGE Learning.

Dow Chemical Company Limited (2018). METHOCEL™ K4M Hydroxypropyl Methylcellulose. 340567/A279 MSDS. <https://www.chempoint.com/products/dupont/methocel-water-soluble-cellulose-ethers/methocel-water-soluble-cellulose-ethers/methocel-k4m>

Dubal, K. L., Ram, V. R., Kher, G. J., Dave, P. N., Joshi, H. S., & Khosla, E. (2016). Comparison of Throat Sprays Containing Chlorhexidine Gluconate and Lidocaine Hydrochloride. *Semantic scholar*, 7(3), (p. 141-150).

EMA. (s.f.). Who we are. European Medicines Agency. Visitado: 10 Septiembre 2022. <https://www.ema.europa.eu/en/about-us/who-we-are>

Espinoza F. S. (s. f.). Especificaciones Producto Terminado Endogel gel tópico. Synthron Chile.

Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., & Riekkola, M.-L. (2017). *Liquid Chromatography* (2^{da} ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8>

FDA, G. R. (1994). Validation of chromatographic methods. center for drug evaluation and research (CDER). Food and Drug Administration, 2.

FDA. (2006). Guidance for Industry: Quality Systems Approach to Pharmaceutical CGMP Regulations. <https://www.fda.gov/media/71023/download>

FDA. (2014). Corrective and Preventive Actions (CAPA). FDA. Visitado: 22 Noviembre 2021. <https://www.fda.gov/corrective-and-preventive-actions-capa>

FDA. (2015). Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>

FDA. (2018). What We Do. FDA; FDA. Visitado: 28 junio 2021. <https://www.fda.gov/about-fda/what-we-do>

FDA. (2020). Methods, Method Verification and Validation. <https://www.fda.gov/media/73920/download>

Felton L. (2013) Remington: Essentials of Pharmaceutics. American Journal of Pharmaceutical Education, 77(10).

Greenstein, G., Berman, C., & Jaffin, R. (1986). Chlorhexidine: An Adjunct to Periodontal Therapy. Journal of Periodontology, 57(6), p. 370–377. <https://doi.org/10.1902/jop.1986.57.6.370>

Guideline, ICH (2005a). Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 1(20), 05.

Guideline, ICH (2005b). Quality risk management. Q9, Current step, 4, 408.

Guideline, ICH. (2008). Pharmaceutical quality system Q10. Current Step, 4.

Hansch, C., Leo, A., & Hoekman, D. H. (1995). Exploring QSAR.: Hydrophobic, electronic, and steric constants. American Chemical Society.

Havlíková, L., Matysová, L., Nováková, L., Hájková, R., & Solich, P. (2007). HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 43(3), 1169-1173.

ICH (1999). Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances. ICHTRRPHU, Oct, 6, 35.

ICH. (s.f.). Mission—Harmonisation for Better Health. Visitado: 18 junio 2021, <https://www.ich.org/page/mission>

Iso, N. (2005). 9000 Nc-Iso 9000: 2005 Sistemas De Gestión De La Calidad-Fundamentos Y Vocabulario. Nc Iso, 9000.

Jewell, C., Prusakiewicz, J. J., Ackermann, C., Payne, N. A., Fate, G., Voorman, R., & Williams, F. M. (2007). Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(2), p. 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.002>

Mallon, C. B. (2014). U.S. Patent No. 8,920,554. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Masquio Fiorentino, F. A., Correa, M. A., & Nunes Salgado, H. R. (2010). Analytical methods for the determination of chlorhexidine: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(2), 89-101.

MINSAL. (2016). Calidad. Visitado: 20 Marzo 2022. https://www.minsal.cl/medicamentos_calidad/

Miribel, L., Brazier, J. L., Comet, F., & Lecompte, D. (1983). Gas—Liquid chromatographic determination of chlorhexidine in pharmaceutical formulations. *Journal of Chromatography A*, 268, p. 321–328. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)95424-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)95424-X)

Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2011). Chlorhexidine, Cationic disinfectant. En Clarke's analysis of drugs and poisons (4^a ed., p. 1075). Pharmaceutical Press.

Moldoveanu, S. C., & David, V. (2013). Chapter 1—Basic Information about HPLC. En S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Essentials in Modern HPLC Separations* (p. 1–51). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385013-3.00001-X>

Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017a). Chapter 1—Start of the Implementation of a New HPLC Method. En S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis* (p. 1–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00001-9>

Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017b). Chapter 4—Basic Information Regarding the HPLC Techniques. En S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis* (p. 87–187). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00004-4>

Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017c). Chapter 5—Properties of Analytes and Matrices Determining HPLC Selection. En S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis* (p. 189–230). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00005-6>

Nutrition & Biosciences USA 1, LLC (2018). METHOCEL™ E15 Premium LV Hydroxypropyl Methylcellulose. 22947/A749 MSDS. <https://www.chempoint.com/en-emea/products/dupont/methocel-water-soluble-cellulose-ethers/methocel-water-soluble-cellulose-ethers/methocel-e15-premium-lv-1>

Ozawa, S., Higgins, C. R., Yemeke, T. T., Nwokike, J. I., Evans, L., Hajjou, M., & Pribluda, V. S. (2020). Importance of medicine quality in achieving universal health coverage. PLOS ONE, 15(7), e0232966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232966>

Quattrocchi, O. A., de Andrizzi, S. I. A., & Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro.

Red PARF. (2010). Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica. <http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Espanol-control-calidadlaboratorios-farmaceuticos.pdf>.

Rodríguez de Jorge, L. (2018). Eliminación de metil parabeno de disoluciones acuosas mediante procesos avanzados de oxidación: radiación ultravioleta/peróxido de hidrógeno. <https://repositorio.upct.es/xmlui/bitstream/handle/10317/7593/tfg-rod-eli.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sandoval, S. (2010). Guía técnica n. 1–Validación de métodos y de terminación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago, Instituto de Salud Pública de Chile.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons.

Synthon Chile. (s.f. a). Quienes somos. Visitado: 10 Marzo 2022 <https://synthon.cl/nosotros/>

Synthon Chile. (s.f. b). Listado de productos. Visitado: 10 Marzo 2022.
<https://synthon.cl/productos/>

Tetzlaff, J. E. (2000). The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiology Clinics of North America*, 18(2), p. 217–233, v. [https://doi.org/10.1016/s0889-8537\(05\)70161-9](https://doi.org/10.1016/s0889-8537(05)70161-9)

USP. (2017) <1225> Validation of Compendial Procedures. USP 42. En: USP 42–NF 37. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Weston, A., & Brown, P. R. (1997). *High performance liquid chromatography & capillary electrophoresis: principles and practices*. Elsevier.

World Health Organization(WHO). (1992). WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations: 32nd report. Genève, Switzerland: World Health Organization.https://fctc.who.int/publications/i/item/WHO_TRS_823

World Health Organization. (2020). WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: fifty-fourth report. Genève, Switzerland: World Health Organization.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de validación de método analítico identidad y valoración de clorhexidina en Endogel, gel tópico, mediante HPLC.

Synthon

Protocolo de Estudio Analítico. Validación de Método Analítico Identidad y Valoración de Clorhexidina en Endogel gel tópico por HPLC.

Author(s): Manuel Castillo

Tabla de Contenidos

1	Histórico de Cambios	3
2	Introducción	3
3	Objetivo de la validación	3
4	Parámetros de la validación	3
5	Materiales y Equipos	3
5.1	Reactivos y Materiales	3
5.2	Equipos	4
6	Condiciones Instrumentales	4
7	Preparación Soluciones	4
7.1	Preparación Fase Móvil y Soluciones Solventes	4
7.2	Preparación Estándar y Muestra	5
8	Procedimiento Analítico	5
8.1	System Suitability	5
8.2	Verificación del Estándar (Estándar Check)	6
8.3	Especificidad	6
8.4	Linealidad	7
8.5	Precisión	8
8.5.1	Repetibilidad	8
8.5.2	Precisión intermedia	8
8.6	Exactitud	8
8.7	Rango	9
8.8	Robustez	9
8.8.1	Ajustes HPLC	9
8.9	Estabilidad de las Soluciones	10
9	Evaluación	10
10	Referencias	10

1 Histórico de Cambios

Versión	Comentarios
1.0	Nuevo Documento

2 Introducción

El presente protocolo de valoración describe la metodología y los requisitos para demostrar que el método para la Identificación y Valoración de Clorhexidina en Endogel gel tópico por HPLC, el cual es adecuado para el fin previsto.

La validación de este método incluye una breve descripción de los siguientes pasos: System suitability, Estandar check, Selectividad, Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia), Rango y Exactitud. Además, se evaluará el estudio de la estabilidad de las preparaciones y la Robustez del método.

3 Objetivo de la validación

El objetivo de la validación es asegurar el cumplimiento de los requisitos del método. El método debe ser capaz de determinar Clorhexidina en Endogel con suficiente especificidad, precisión y exactitud.

4 Parámetros de la validación

La validación se realizará de acuerdo con la metodología descrita en el ICH Q2 (R1). De acuerdo con esa guía, la validación se centrará en las siguientes características de rendimiento analítico: Selectividad/Especificidad, System Suitability, Estándar Check, Linealidad, Precisión como repetibilidad y precisión intermedia, Exactitud, Rango y Robustez del método. Además, se realizará un estudio de la estabilidad de las preparaciones.

5 Materiales y Equipos

5.1 Reactivos y Materiales

- Estándar Referencia Clorhexidina Acetato
- Fosfato diácido de sodio grado reactivo
- Trietilamina grado reactivo
- Ácido fosfórico grado reactivo
- Matraz volumétrico 100 mL
- Probeta 50 mL
- Filtro de membrana 0.45 μm PVDF
- Filtro de membrana 0.22 μm PVDF
- Viales HPLC
- Columna 4,6 mm \times 25 cm; relleno L1 de 5 μm

5.2 Equipos

- Balanza Analítica
- HPLC
- Sonificador
- Agitador Magnético
- Agitado mecánico

6 Condiciones Instrumentales

Tabla N°1 Valoración e Identificación

Equipo	: HPLC
Columna	: 4,6 mm × 25 cm; relleno L1 de 5 µm
Temperatura del horno	: 40°C
Detector	: UV
Velocidad de flujo	: 1.5 mL/min
Volumen Inyección	: 50 µL
Tiempo de corrida	: 21 min
Longitud de onda	: 239 nm
Elución	: Gradiente
Fase móvil	: Ver tabla 2

Tabla N°2: Gradiente fase móvil

Tiempo (min)	Solución A	Solución B	Flujo (ml/min)
0	100	0	1,5
9	100	0	1,5
10	45	55	1,5
15	45	55	1,5
16	100	0	1,5
21	100	0	1,5

7 Preparación Soluciones

7.1 Preparación Fase Móvil y Soluciones Solventes

Solución amortiguadora: Disolver 27,6 g de fosfato de sodio dihidrógeno (NaH₂PO₄) y 10mL de trietilamina en 1,5 litros de agua. Ajustar con ácido fosfórico 85% a un pH de 3,0 y diluir con agua hasta 2 litros.

Solución A: Acetonitrilo y *Solución amortiguadora* (30:70)

Solución B: Acetonitrilo

Fase Móvil: Realizar una mezcla de Solución A y Solución B, según tabla N°2. Desgasificar y filtrar por filtro de membrana de 0.45 µm PVDF

7.2 Preparación Estándar y Muestra

Solución estándar: Pesar exactamente 6,2 mg de Clorhexidina acetato estándar y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 µm (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,06 mg/ml*)

Solución System suitability: Utilizar *solución estándar*

Solución muestra: Realizar un pool con 10 jeringas y pesar con exactitud alrededor de 12gr de muestra, colocarlo en un matraz volumétrico de 100mL y agregar 70 mL de solución A, luego someter a ultrasonido agitando intermitentemente por 30 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0.22 µm. (*Concentración de Clorhexidina digluconato: 0,06 mg/ml*)

Para realizar cálculos con respecto a la concentración de Clorhexidina digluconato en la solución muestra, se propone la siguiente fórmula matemática:

$$\% CHX = \frac{A_{mta}}{A_{std}} \times \frac{C_{std}}{C_{mta}} \times \frac{M_{glu}}{M_{act}} \times 100$$

Donde:

- A_{mta} = Área promedio de las inyecciones en la *Solución Muestra*
- A_{std} = Área promedio de las inyecciones de la *Solución Estándar* de Clorhexidina Acetato
- C_{std} = Concentración de Clorhexidina acetato en la *Solución estándar*
- C_{mta} = Concentración de Clorhexidina digluconato en la *Solución muestra*
- M_{glu} = Peso molecular de Clorhexidina gluconato (897,76 g/mol)
- M_{act} = Peso molecular de Clorhexidina acetato (625,55 g/mol)

8 Procedimiento Analítico

8.1 System Suitability

Se evaluará a través de 5 inyecciones de *preparación estándar*, descrita en el punto 7.2, de acuerdo a la siguiente tabla propuesta:

Tabla N°3: Secuencia propuesta System Suitability

<i>Nombre del Vial</i>	<i>Número de Inyecciones</i>
Preparación System Suitability	1
Solución Blanco	2
Preparación System Suitability	5
Solución Blanco	1

Tabla N°4 Criterios de Aceptación

Peak	N	T	RSD (tr)(%)	RSD (A) (%)
Clorhexidina digluconato	≥ 2000	≤ 2.0	≤ 1.0	≤ 1.0

8.2 Verificación del Estándar (Estándar Check)

Preparar en duplicado (A y B) solución estándar, tal como se describe en preparación de soluciones e inyectar dichas soluciones según la siguiente secuencia:

Tabla N°5: Secuencia propuesta Estándar Check

Nombre del Vial	Número de inyecciones
Solvente (Blanco)	1
Solución Estándar A	2
Solución Estándar B	2

Use las dos inyecciones de Std A y las dos inyecciones de Std B para el cálculo del estándar Check con la siguiente ecuación:

$$\%Recuperación = \frac{C_{std A}}{A_{std A}} \times \frac{A_{std B}}{C_{std B}} \times 100$$

Donde:

A_{STD A} : Promedio Área de Estándar A.

A_{STD B} : Promedio Área de Estándar B.

C_{STD A} : Concentración Estándar A.

C_{STD B} : Concentración de Estándar B.

Si la recuperación no es 99 – 101 %, se debe descartar la preparación estándar Check y preparar una nueva preparación estándar.

8.3 Epecificidad

El estudio de especificidad debe asegurar que no hay interferencias procedentes de soluciones solventes y preparaciones de placebo en el tiempo de retención de Clorhexidina en “Endogel”. Por lo tanto, se inyectará solución solvente, preparación placebo y solución estándar, teniendo en cuenta la fórmula:

Tabla N°6: Fórmula cuali-cuantitativa:

Descripción	Cantidad 100 mL	Cantidad por jeringa
Lidocaine hydrochloride monohydrate	3.200 g	320 mg
Methylparaben	0.060 g	6 mg
Propylparaben	0.025 g	2.5 mg
Methocel	8.300 g	830 mg
Agua Purificada (d= 1,000 g/ mL)	100 mL	10 mL

Para llevar a cabo este estudio se sugiere la siguiente preparación placebo:

Preparación placebo: Pesar con exactitud alrededor de 12 gr de placebo de Endogel en matraz volumétrico de 100mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 µm, descartar los primeros 2 mL y llevar a un vial.

Criterios de aceptación:

No hay co-elución de peak de solvente y placebo en el tiempo de retención de Clorhexidina.

8.4 Linealidad

La linealidad de Clorhexidina se determinará mediante el análisis de un mínimo de cinco Preparaciones para la linealidad con concentraciones que van por lo menos desde 80% al 120% del valor definido en 100%. Todos los preparados se inyectarán una vez y en orden creciente de concentración. Se realizará un análisis de regresión lineal de la concentración versus el área. Para realizar este estudio se sugiere utilizar las siguientes preparaciones propuestas:

- Preparación para la linealidad al 120%: Pesar aproximadamente 7,44 mg de Estandar de Clorhexidina acetato, y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 µm, (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,072mg/ml*)
- Preparación para la linealidad al 110%: Pesar aproximadamente 6,82 mg de Estandar de Clorhexidina acetato, y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 µm, (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,066mg/ml*)
- Preparación para la linealidad al 100%: Pesar aproximadamente 6,2 mg de Estandar de Clorhexidina acetato, y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 µm, (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,06mg/ml*)
- Preparación para la linealidad al 90%: Pesar aproximadamente 5,58 mg de Estandar de Clorhexidina acetato, y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen

con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 μm , (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,054mg/ml*)

- Preparación para la linealidad al 80%: Pesar aproximadamente 4,96 mg de Estandar de Clorhexidina acetato, y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 μm , (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,048mg/ml*)

Criterio de aceptación:

- Regresión (r) ≥ 0.99
- Intercepto $\leq 3\%$ (del área al 100%)

8.5 Precisión

8.5.1 Repetibilidad

Para la repetibilidad, se determinará el contenido de Clorhexidina digluconato mediante el análisis de seis preparaciones muestra independientes a una concentración del 100%, preparadas como se especifica en el punto 7.2

Criterio de aceptación:

RSD $\leq 1.5\%$ (repetibilidad de seis muestras).

8.5.2 Precisión intermedia

Para la precisión intermedia, se realizará un segundo estudio de repetibilidad por una analista diferente en un día diferente, utilizando un instrumento diferente.

Criterio de aceptación:

RSD $\leq 2.0\%$ (repetibilidad de doce muestras)

8.6 Exactitud

La exactitud se realizará con presencia de placebo y Clorhexidina acetato, que cubre el rango de linealidad, es decir, los niveles desde 0,048 mg/ml (80%), hasta 0,072 mg/mL (120%).

Cada nivel se preparará por triplicado, se inyectará una vez y en orden creciente de concentración.

La recuperación, expresada en %, se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$R (\%) = (\text{Cantidad determinada} / \text{Cantidad agregada}) \times 100$$

Criterio de aceptación:

El % de recuperación de la muestra individual debe estar entre el 98.0% y el 102.0% en cada nivel investigado.

Para realizar el estudio de la exactitud se sugieren las siguientes preparaciones:

- Preparación para la exactitud al 80 %: Pesar aproximadamente 12g de placebo y 4,96 mg de estándar de clorhexidina acetato en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de

solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 μm . descartar los primeros 2 mL y llevar a un vial. (Concentración: 0,048 mg/mL).

- Preparación para la exactitud al 100%: Pesar aproximadamente 12 g de placebo y 6,2 mg de estándar de clorhexidina acetato en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 μm , descartar los primeros 2 mL y llevar a un vial. (Concentración: 0,06 mg/mL).
- Preparación para la exactitud al 120%: Pesar aproximadamente 12 g de placebo y 7,44 mg de estándar de clorhexidina acetato en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 70 mL de solución A y colocarlo en el agitador mecánico por 10 minutos. Finalmente llevar a volumen con solución A. Filtrar por filtro de membrana PVDF 0,22 μm . descartar los primeros 2 mL y llevar a un vial. (Concentración: 0,072 mg/mL).

8.7 Rango

Si los resultados de la linealidad, precisión y exactitud cumplen el criterio de aceptación, el rango de la concentración de la muestra se establece entre el 80 y el 120 % de la concentración objetivo (el 100% corresponde a 0,06 mg/ml de Clorhexidina acetato por mL).

8.8 Robustez

Los parámetros más influyentes serán evaluados a través de la variación de su valor dentro de un rango establecido y midiendo el efecto de dicha variación se evaluarán variando su valor dentro de un rango y midiendo el efecto sobre el método mediante el seguimiento de una preparación estándar. Como conclusión del estudio, si es posible, se proporcionarán los intervalos de trabajo adecuados para cada parámetro. Si hay un parámetro que podría ser crítico y no se pueden proporcionar intervalos adecuados, se debe informar en el QC describiendo que el parámetro es crítico.

8.8.1 Ajustes HPLC

Se estudiará la robustez con Preparación Estándar al cambiar los parámetros del método HPLC ligeramente de los ajustes nominales. Los parámetros sugeridos corresponden a los siguientes:

- Velocidad de flujo: 1.5mL/min \pm 0.2 ml/min
- Temperatura de la columna: 40°C \pm 5°C
- Longitud de onda: 239 nm \pm 2 nm

Criterio de aceptación: El contenido de Clorhexidina acetato en la preparación estándar y de Clorhexidina digluconato en la preparación de muestra deben estar entre 99% y 101%

8.9 Estabilidad de las Soluciones

La estabilidad de las preparaciones de Clorhexidina será determinada comparando el área del peak de las preparaciones a diferentes tiempos y condiciones, con el área del peak de las preparaciones a $t=0$. En $t=0$, la concentración relativa inicial se considerará como 100%.

Preparaciones:

Solución Estándar y Muestra.

Condiciones:

Refrigerador (2-8°C/oscuridad)

Temperatura ambiente (luz)

Temperatura ambiente (oscuridad)

Evaluar las soluciones por al menos 5 días

Criterio de aceptación:

El contenido de Clorhexidina debe estar entre 98% - 102%.

9 Evaluación

Después de analizar el conjunto de datos obtenidos de cada parámetro se escribirá un reporte de validación

Cualquier desviación del protocolo será registrado y evaluado su impacto sobre la validación

10 Referencias

- Validación de los procedimientos analíticos: definiciones y terminología, ICH, tema Q2 (R1) (Conferencia Internacional de Armonización)
- SOP.CL01.73020 "Procedimiento Operativo Estándar Validación de Métodos Analíticos"
- SOP.SYN.008 "Standard Operating Procedure Analytical Method Validation"

Anexo 2. Reporte de validación de método analítico identidad y valoración de clorhexidina en Endogel, gel tópico, mediante HPLC.

Synthon

Reporte de Validación. Identidad y Valoración de Clorhexidina en Endogel, gel tópico, por HPLC.

Author(s): Camila Zuloaga/Manuel Castillo

Tabla de Contenidos

1	Histórico de Cambios	3
2	Introducción	3
3	Propósito de Validación	3
4	Resumen de resultados	3
Tabla 1. Resumen de resultados correspondientes a validación de método		3
5	Referencias	6
5.1	Procedimientos específicos de control de calidad	6
6	Materiales de referencia y muestras	6
6.1	Materiales	6
6.2	Equipos	6
7	Descripción del sistema	7
7.1	Condiciones Cromatográficas	7
8	Preparación de soluciones	8
8.1	Soluciones fase móvil	8
8.2	Preparación estándar y muestra .	8
9	Parámetros a evaluar	10
10	Resultados	10
10.1	System Suitability Test	10
10.2	Standard Check	10
10.3	Especificidad	11
10.4	Linealidad	15
10.5	Precisión	18
10.5.1	Repetibilidad	18
10.5.2	Precisión Intermedia	19
10.6	Exactitud	19
10.7	Rango	20
10.8	Estabilidad	21
11	Robustez	22
11.1	Parámetros de configuración HPLC:	22
11.1.1	Variación velocidad de Flujo	22
11.1.2	Variación temperatura de columna	23
11.1.3	Variación de longitud de onda	24
12	Conclusión	25
13	Desviaciones	26
13.1	Desviaciones del protocolo.	26

1 Histórico de Cambios

Versión	Comentarios
1.0	Creación de documento

2 Introducción

El presente reporte de validación contiene los resultados obtenidos para análisis de identificación y valoración de Clorhexidina digluconato en Endogel gel tópico mediante HPLC.

El reporte de validación de este método incluye los resultados de los siguientes pasos: System Suitability, Estandar Check, Selectividad como Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión como repetibilidad, precisión Intermedia y rango. Además, se evaluará la estabilidad de las soluciones y la robustez del método.

3 Propósito de Validación

El propósito de validación es garantizar el cumplimiento de los requisitos del método. El método debería ser capaz de determinar Clorhexidina digluconato con suficiente selectividad, precisión y exactitud.

4 Resumen de resultados

Tabla 1. Resumen de resultados correspondientes a validación de método

<i>Parámetros de Validación</i>	<i>Resultado</i>	<i>Criterio de aceptación</i>
System Suitability Test	RSD Área (%) = 0,1% RSD tr = 0,1% N = 44307 T = 1,4 Cumple	N ≥ 2000 T ≤ 2,0 RSD tr (%) ≤ 1,0% RSD Área (%) ≤ 1,0%
Estándar Check	100% Cumple	99-101%
Especificidad	Mediante evaluación de especificidad se observa que las señales de preparación solvente y placebo no interfieren con la señal del peak de clorhexidina acetato. Cumple	No hay co-elución de los peak en el solvente ni placebo, con el tiempo de retención del estándar de Clorhexidina acetato.

Linealidad	<p>Regresión (r) = 0,99</p> <p>Intercepto= 59447 $\mu\text{V}^*\text{s} \leq 90005$ (3% de 3000154 $\mu\text{V}^*\text{s}$)</p> <p>Cumple</p>	<p>Regresión (r) $\geq 0,99$</p> <p>Intercepto $\leq 3\%$ (del área del peak al nivel del 100%)</p>
Exactitud	<p>Resultados de Recuperación promedio (tres preparaciones) de exactitud por nivel:</p> <p>80% = 98 % 100% = 99 % 120% = 98 %</p> <p>Cumple</p>	<p>El % de recuperación de la muestra individual debe estar entre el 98 % -102 % en cada nivel investigado.</p>
Precisión (Repetibilidad)	<p>RSD (%): 0,7 %</p> <p>Cumple</p>	<p>RSD $\leq 1,5 \%$ (repetibilidad de seis muestras)</p>
Precisión Intermedia	<p>RSD (%): 0,8 %</p> <p>Cumple</p>	<p>RSD $\leq 2,0\%$ (repetibilidad de doce muestras)</p>
Rango	<p>Cumple</p>	<p>Si los resultados de linealidad, precisión y exactitud cumplen el criterio de aceptación, el rango de concentración de la muestra se establece entre el 80 y 120 % de la concentración objetivo (el 100% corresponde a 0,064 mg/mL de Clorhexidina acetato)</p>

<p align="center">Estabilidad</p>	<p>Preparación Estándar es estable 4 días en condiciones de ambiente/oscuridad y 8 días en condiciones ambiente/luz y refrigerado/oscuridad. (98% - 102%)</p> <p>Preparación Muestra es estable 8 días en condiciones de ambiente/luz, ambiente/oscuridad y refrigerado/oscuridad. (98% - 102%)</p> <p align="center">Cumple</p>	<p>El contenido de Clorhexidina debe estar entre 98% - 102%</p>
<p align="center">Robustez</p> <p>Flujo 0.8 mL/min Flujo 1.2 mL/min</p> <p>Temperatura de columna 20°C Temperatura de columna 30°C</p> <p>Longitud de onda 237 nm Longitud de onda 241 nm</p>	<p>F calculado = 185509,93 F crítico= 3,89 F cal > F crítico No Cumple</p> <p>F calculado = 1008,63 F crítico = 3,89 F cal > F crítico No Cumple</p> <p>F calculado = 2558,05 F crítico = 3,89 F cal > F crítico No Cumple</p> <p>No es robusto a variaciones de flujo, temperatura de columna ni longitud de onda.</p>	<p>Los resultados obtenidos para cada parámetro deben estar dentro del intervalo de confianza (error aleatorio), para considerar que el parámetro no afecta a los resultados</p> <p>F cal < F crítico Para concluir que no existen diferencias significativas entre las tres variables.</p>

5 Referencias

5.1 Procedimientos específicos de control de calidad

Tabla 2. Documentos y/o procedimientos específicos de control de calidad utilizados como referencia.

Test	Método
Protocolo de Estudio Analítico. Validación de Método Analítico: Identidad y Valoración de Clorhexidina en Endogel gel tópico por HPLC.	SVP.CL01.90263 (1.0)

6 Materiales de referencia y muestras

Tabla 3. Materiales de referencia, muestras y placebo con su correspondiente información

Nombre	N° Lote/Vencimiento
Estandar Referencia Clorhexidina Acetato	STD.ORS-42 USP Lote: R077K0 Vence: Vigente según USP online Potencia: 96,90%
Estandar Referencia Lidocaina Clorhidrato	Lote: LRAB3669 Vence: 12-2021
Muestra Endogel	Lote: C2100955A Vence: 30-09-2022 Lote: G2102009A Vence: 31-01-2023
Placebo Endogel	Sin API Lote: LDC+CLORHEXIDINA-PT060R1-1 Vence: 06-2026 Cargado con LDC Lote: LDC-PT07021-1 Vence: 07-2026

6.1 Materiales

- Fosfato de sodio monobásico dihidratado (NaH₂PO₄ x 2H₂O); grado reactivo Lote: K93717142 Vence: 10-2021
- Agua Milli-Q; grado HPLC, Lote: 20654633 Vence: 01-2024
- Trietilamina; grado reactivo, Lote: 57956052 Vence: 01-2024
- Ácido ortofosfórico (85% H₃PO₄); grado reactivo, Lote: K51939773 Vence: 01-2023
- Acetonitrilo grado HPLC, Lote: K52553130 Vence: 07-2023
- 2-propanol grado HPLC, Lote: K52346440 Vence: 12-2022

6.2 Equipos

- HPLC; SCL.AFQ.0210 Cal:11-2021
- Columna analítica: Luna C18 (Phenomenex, 250 x 4.6 mm, dp=5µm)
- Pre-columna analítica: Security Guard C18 (Phenomenex 4 mm x 3 mm) + porta pre-columna.
- Microbalanza SCL-AFQ-0177 Cal: 11-2021
- Balanza SCL-AFQ-0271 Cal: 01-2022
- Balanza SCL-AFQ-0015 Cal: 05-2022
- Balanza SCL-AFQ-0277 Cal: 11-2021
- Balanza SCL-AFQ-0437 Cal: 05-2022
- Baño de ultrasonido SCL-AFQ-0521 Cal: 05-2022

- Agitador mecánico SCL-AFQ-0006 Cal: 11-2021
- Agitador vortex
- pH-metro SCL.AFO.0364 Cal:10-2021
- Filtro de membrana 0.45 μm PVDF
- Filtro de Disco Millipore 0.22 μm PVDF
- Matraces volumétricos ambar 100 mL
- Viales ambar HPLC.

7 Descripción del sistema

7.1 Condiciones Cromatográficas

Tabla 4. Condiciones cromatográficas

Detector	: UV
Columna	: Luna C18 (Phenomenex, 250 x 4.6 mm, $d_p=5\mu\text{m}$)
Pre - columna	: Security Guard C18 (Phenomenex 4 mm x 3 mm)
Solución de lavado	: Isopropanol 10%
Temperatura Columna	: 25°C
Temperatura Muestras	: 25°C
Velocidad de Flujo	: 1,0 mL/min
Volumen de Inyección	: 20 μL
Tiempo de corrida	: 35 min
Longitud de Onda	: 239 nm
Elución	: Gradiente
Fase móvil	: Ver tabla 5
Lavado de columna a 35°C	: Ver tabla 6

Tabla 5. Gradiente fase móvil

Tiempo (min)	Solución A (Buffer Fosfato) (%)	Solución B (ACN) (%)	Flujo (ml/min)
0	85	15	1,0
2	85	15	1,0
5	80	20	1,0
9	75	25	1,0
10	75	25	1,0
12	70	30	1,0
15	70	30	1,0
20	70	30	1,0
21	85	15	1,0
30	85	15	1,0
35	85	15	1,0

Tabla 6. Gradiente para lavado de columna.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Solución A (Agua Milli-Q) (%)</i>	<i>Solución B (MeOH) (%)</i>	<i>Solución C (ACN) %</i>	<i>Flujo (ml/min)</i>
1	90	10	0	1,0
30	90	10	0	1,0
31	50	50	0	1,0
45	50	50	0	1,0
46	50	0	50	1,0
60	50	0	50	1,0
61	10	0	90	1,0
70	10	0	90	1,0
71	10	0	90	0,0

8 Preparación de soluciones

8.1 Soluciones fase móvil

Solución A Buffer Fosfato de sodio 50mM: Pesar 7,8 g de Fosfato de sodio monobásico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y disolver en 1000 mL de agua Milli-Q grado HPLC. Añadir 2,5 ml de Trietilamina y ajustar pH a $3,0 \pm 0,05$ con ácido fosfórico 85% y llevar a volumen usando agua Milli-Q. Filtrar la solución por filtro de membrana PVDF 0,45 μm y desgasificar en baño de ultrasonido.

Solución B: Acetonitrilo grado HPLC.

Solución Solvente: Buffer Fosfato de sodio 50 mM pH 3,0: Acetonitrilo (85:15).

8.2 Preparación estándar y muestra .

Preparación Solución Estándar Clorhexidina Acetato: Pesar exactamente 6,44 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL. Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0.064 mg/ml*).

Preparación Muestra Endogel: Realizar un pool con 10 jeringas y pesar 12,88 g de muestra, (equivalente a 12880 mg) llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL y agregar 70 mL de solución solvente; posteriormente sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (*Concentración de Clorhexidina digluconato: 0.064 mg/ml*).

Preparación System Suitability: Usar *Preparación Solución Estándar Clorhexidina Acetato*.

Preparación placebo: Pesar con exactitud alrededor de 12,88 g de placebo Endogel, llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL y agregar 70 mL de solución solvente; posteriormente sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm .

Preparación Solución Estándar Lidocaina: Pesar exactamente 386,4 mg de estándar de referencia Lidocaina Clorhidrato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (*Concentración de Lidocaina Clorhidrato: 3,864 mg/ml*).

Preparación excipiente Propilparabeno: Pesar aproximadamente 3,22 mg de excipiente Propilparabeno, llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL y agregar 70 mL de solución solvente; posteriormente sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm .

Preparación excipiente Metilparabeno: Pesar aproximadamente 7,73 mg de excipiente Metilparabeno, llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL y agregar 70 mL de solución solvente; posteriormente sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm .

Preparación excipiente Methocel: Pesar aproximadamente 0,106 g de excipiente Methocel, llevar a matraz volumétrico ámbar 10 mL y agregar 7 mL de solución solvente; posteriormente sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual y agitación en vortex. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm .

9 Parametros a evaluar

La validación se centró en las siguientes características de rendimiento analítico: System Suitability, Estándar Check, Especificidad, Linealidad, Precisión como repetibilidad, Precisión intermedia, Exactitud y Rango. Además, se evaluó un estudio de estabilidad de las preparaciones y la robustez del método.

10 Resultados**10.1 System Suitability Test**

Tabla 7. System Suitability Test

<i>Inyección</i>	<i>Área ($\mu V*s$)</i>	<i>Tiempo de Retención (minutos)</i>	<i>Platos Teóricos (USP)</i>	<i>Tailing (USP)</i>
1	2984192	21,6	44947	1,4
2	2983165	21,6	44458	1,4
3	2989220	21,6	43670	1,4
4	2986574	21,6	43778	1,4
5	2981060	21,6	44684	1,4
Promedio	2984842	21,6	44307	1,4
RSD (%)	0.1	0.1	N/A	N/A
Criterio de aceptación	RSD (%) \leq 1,0	RSD (%) \leq 1,0	\geq 2000	\leq 2,0
Conclusión	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

10.2 Standard Check

Tabla 8. Standard Check

<i>Muestra</i>	<i>Área ($\mu V*s$)</i>	<i>Área promedio ($\mu V*s$)</i>	<i>Peso estándar (mg)</i>
Std A 1 ^{ro}	2985383,95	2986624	6,440
Std A 2 ^{do}	2987864,48		
Std B 1 ^{ro}	2985931,65	2987612	6,441
Std B 2 ^{do}	2989291,84		
Standard Check	100 %		
Criterio Aceptación	99% - 101%		
Conclusión	Cumple		

10.3 Especificidad

El estudio de especificidad debe asegurar que no existen interferencias procedentes de la preparación de solución solvente y placebo en el tiempo de retención de Clorhexidina en “Endogel”. Por lo tanto, se inyectará solución solvente, preparación placebo y solución estándar Clorhexidina Acetato.

Además, con el fin de identificar todos los peaks resultantes de la solución muestra se ejecuta preparación y lectura de Placebo cargado con principio activo Lidocaína, solución estándar Lidocaína, excipiente Propilparabeno, excipiente Metilparabeno y excipiente Methocel.

Nota: esta data es solo informativa.

Criterio de aceptación: No hay co-elución de peak de solvente, placebo ni Lidocaína clorhidrato, en el tiempo de retención de Clorhexidina Acetato.

Figura 1. Cromatograma preparación Solvente.

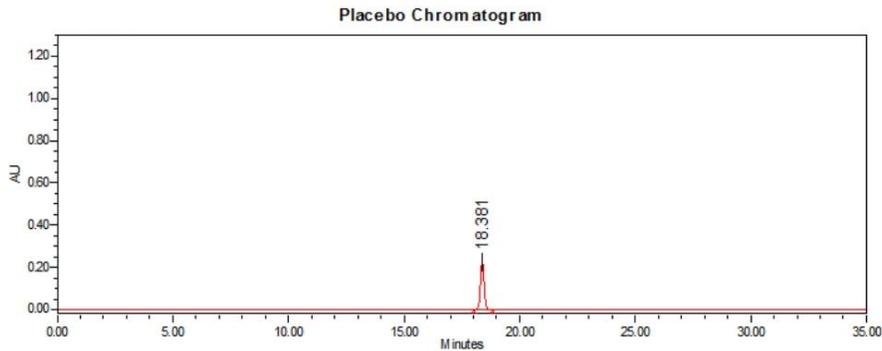


Figura 2. Comatograma solución placebo sin principios activos añadidos

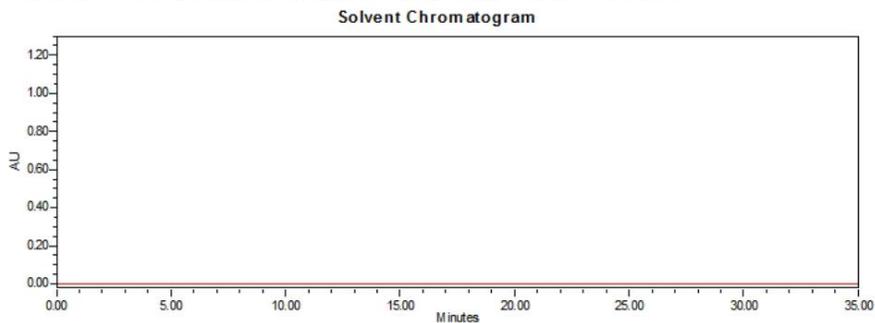


Figura 3. Comatograma solución placebo con principio activo Lidocaina.

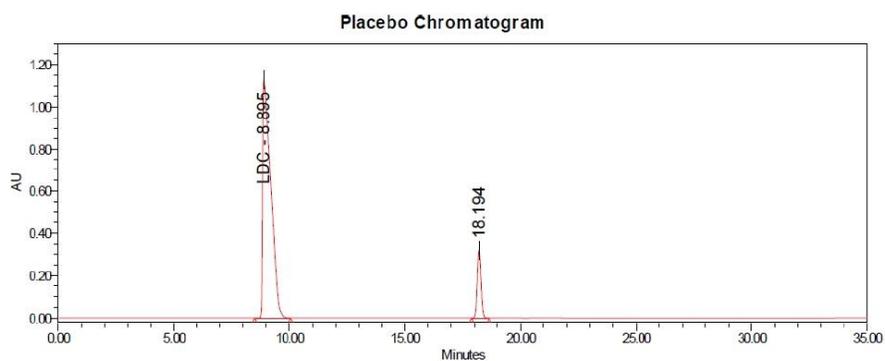


Figura 4. Cromatograma preparación estándar Clorhexidina acetato.

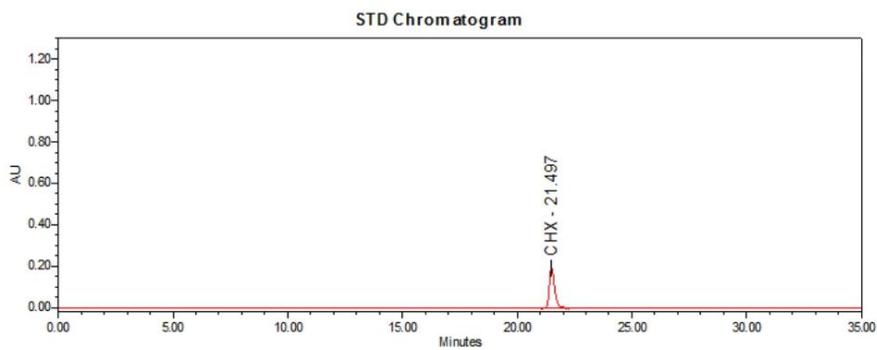


Figura 5. Cromatograma preparación estándar Lidocaína Clorhidrato.

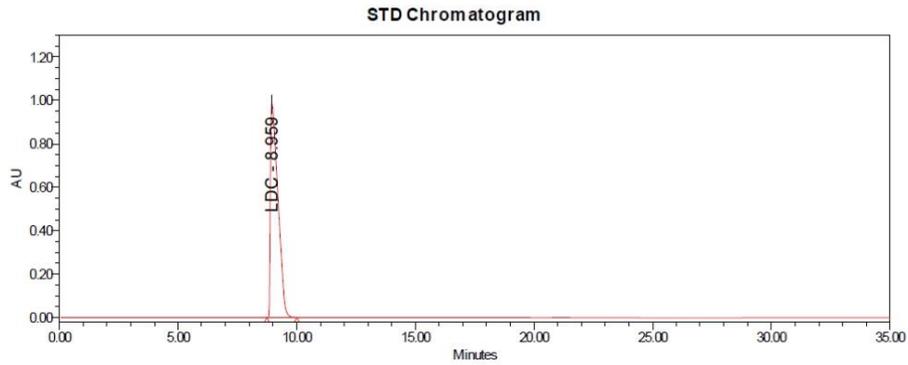


Figura 6. Cromatograma preparación excipiente Propilparabeno para identificación de peak.

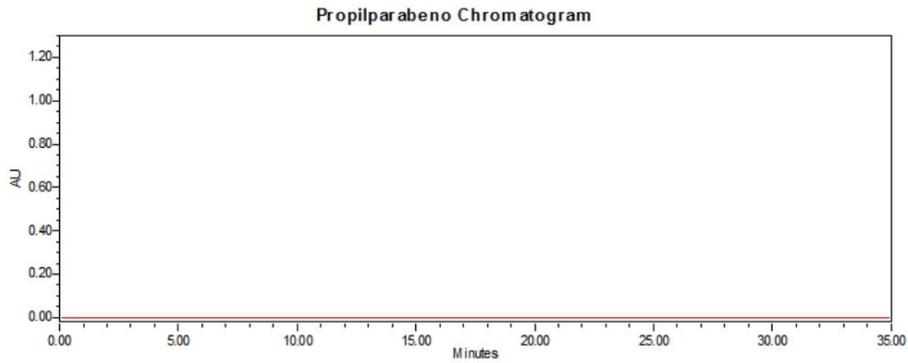


Figura 7. Cromatograma preparación excipiente Metilparabeno para identificación de peak.

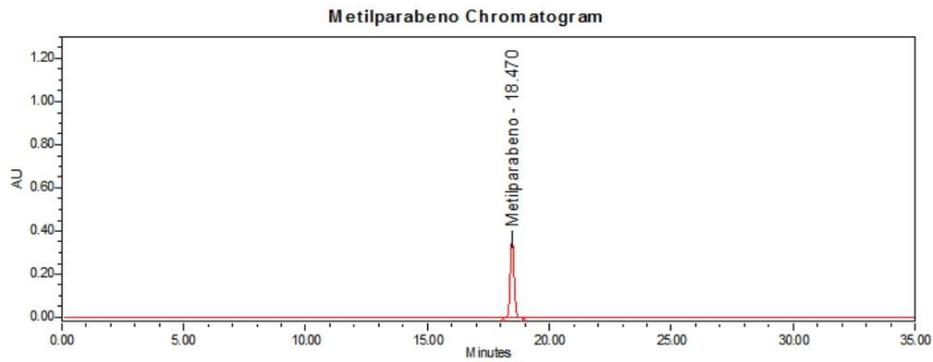


Figura 8. Cromatograma preparación excipiente Methocel para identificación de peak.

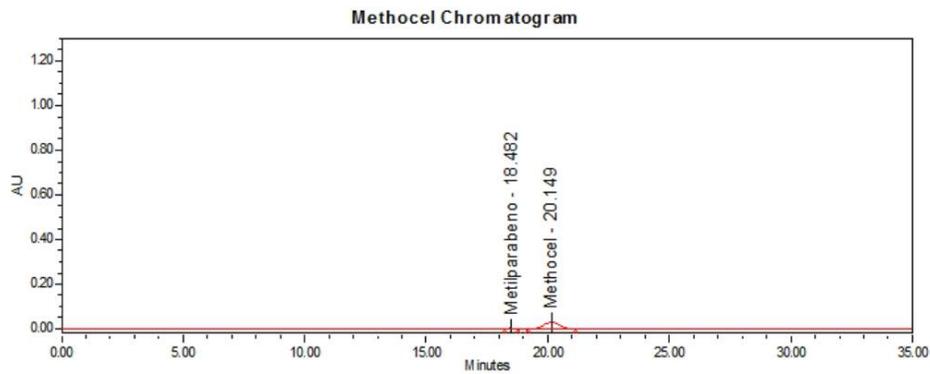


Tabla 9. Resultados estudio de especificidad del método.

	<i>Preparación</i>	<i>Nombre API</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>	<i>Área ($\mu V*s$)</i>
1	Placebo sin API	-	18,4	2596072
2	Placebo con API	Lidocaina	8,9	27176649
3	Estandar	Clorhexidina	21,5	2990246
4	Estandar	Lidocaina	9,0	21703377
5	Excipiente	Propilparabeno	-	-
6	Excipiente	Metilparabeno	18,5	4057230
7	Excipiente	Methocel	20,1	1350906

Conclusión: No se observa co-elución de peak de solvente y placebo en el tiempo de retención de clorhexidina.

*En el caso de excipiente Methocel, este se identifica en un tiempo de retención cercano al peak de Clorhexidina pero se debe tener en consideración que este se presenta como carry over en las secuencias de muestra, es por esto, que se incluye 3 inyecciones solvente entre cada inyección de muestra.

10.4 Linealidad

La linealidad de Clorhexidina se determina mediante el análisis de un mínimo de cinco Preparaciones para la linealidad con concentraciones que van por lo menos desde 80% al 120% del valor definido en 100%.

Preparación de soluciones:

Linealidad 80%: Pesar aproximadamente 5,152 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 ml. Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,052 mg/ml*).

Linealidad 90%: Pesar aproximadamente 5,796 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 ml. Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,058 mg/ml*).

Linealidad 100%: Pesar aproximadamente 6,44 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 ml. Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (Concentración de Clorhexidina acetato: 0,064 mg/ml).

Linealidad 110%: Pesar aproximadamente 7,084 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 ml. Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (Concentración de Clorhexidina acetato: 0,071 mg/ml)

Linealidad 120%: Pesar aproximadamente 7,728 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 ml. Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (Concentración de Clorhexidina acetato: 0,077 mg/ml)

Tabla 10. Resultados concentración y áreas correspondientes a estudio de linealidad para curva de calibración.

% Curva	Concentración (mg/ml) ¹	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Promedio Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)
80	0,0499	2386417	2387600
		2388954	
		2387428	
90	0,0556	2665458	2668687
		2670258	
		2670344	
100	0,0624	2997808	3000154
		3001516	
		3001139	
110	0,0687	3310694	3309996
		3311165	
		3308129	
120	0,0748	3609506	3609521
		3612511	
		3606547	

¹ Concentraciones ajustadas por potencia (Potencia estandar: 96,9%)

Figura 9. Curva de calibración Linealidad.

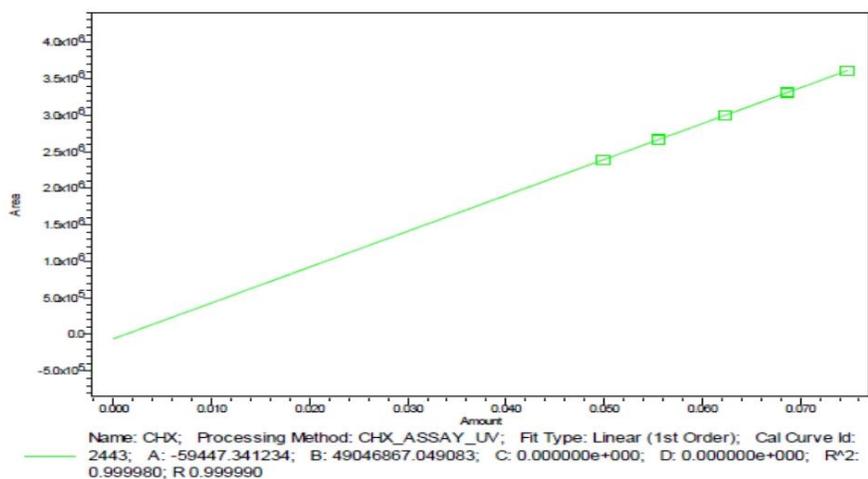


Tabla 11. Resultados obtenidos mediante curva de calibración del estudio de linealidad.

Ecuación de la recta	$Y = 49046867X - 59447$
Pendiente (b)	49046867
Intercepto (a)	59447
r^2	0,99
Regresión (r)	0,99

Tabla 12. Criterios de Aceptación y resultados.

<i>Criterios de Aceptación</i>	<i>Resultados</i>	<i>Conclusión</i>
Regresión (r)	0,99	Cumple
Intercepto $\leq 3\%$ (al área al 100%)	$59447,34 \leq 90005$	Cumple

10.5 Precisión**10.5.1 Repetibilidad**

Para la repetibilidad, se determina el contenido de Clorhexidina digluconato mediante el análisis de seis preparaciones muestra independientes a una concentración del 100% (0,064 mg/ml), preparadas como se especifica en el punto 8.2.

Criterio de aceptación: RSD \leq 1.5 % (repetibilidad de seis muestras).

Tabla 13. Resultados repetibilidad de seis muestras

<i>Nº lecturas</i>	<i>Pesos de muestra (g)</i>	<i>Área ($\mu V*s$)</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>% Clorhexidina digluconato</i>
1	12,9169	2127944	0,0645845	97
2	12,9040	2145796	0,0645200	98
3	12,9187	2161698	0,0645935	99
4	12,8888	2127977	0,0644440	98
5	12,8948	2157528	0,0644740	99
6	12,9052	2153357	0,0645100	99
Promedio:	N/A	2145717	0,0645210	98
RSD (%):	N/A	N/A	0,7	0,7
Criterio Aceptación	N/A	N/A	N/A	RSD \leq1,5 %
Conclusión	-	-	-	Cumple

10.5.2 Precisión Intermedia

Para la precisión intermedia, se realiza un segundo estudio de repetibilidad por un analista diferente.

Criterio de aceptación: RSD \leq 2,0% (repetibilidad de doce muestras).

Tabla 14. Resultados precisión intermedia, repetibilidad de doce muestras.

<i>Nº lecturas</i>	<i>Pesos de muestra (g)</i>	<i>Área (μV^*s)</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>% Clorhexidina digluconato</i>
1	12,9169	2127944	0,0645845	97
2	12,9040	2145796	0,0645200	98
3	12,9187	2161698	0,0645935	99
4	12,8888	2127977	0,0644440	98
5	12,8948	2157528	0,0644740	99
6	12,9052	2153357	0,0645100	99
7	12,9101	2137833	0,0645505	98
8	12,8992	2118922	0,0644960	97
9	12,8937	2154541	0,0644685	99
10	12,8875	2150225	0,0644375	99
11	12,8910	2145682	0,0644550	98
12	12,9068	2156124	0,0645340	99
Promedio:	N/A	2144802	0,0645056	98
RSD (%):	N/A	N/A	0,6	0,8
Criterio Aceptación	N/A	N/A	N/A	RSD \leq 2,0 %
Conclusión	-	-	-	Cumple

10.6 Exactitud

La exactitud se realiza con presencia de placebo y Clorhexidina acetato, en el mismo rango estudiado para el estudio de linealidad, es decir, los niveles desde 80% (0,052 mg/ml) hasta el nivel 120% (0,077 mg/mL).

Preparación de soluciones:

Exactitud 80%: Pesar aproximadamente 12,88 g de placebo y 5,152 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato en matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Agregar 70 mL de solución solvente y sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (*Concentración Clorhexidina Acetato: 0,052 mg/ml*).

Exactitud 100%: Pesar aproximadamente 12,88 g de placebo y 6,440 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato en matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Agregar 70 mL de solución solvente y sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (Concentración Clorhexidina Acetato: 0,064 mg/ml).

Exactitud 120%: Pesar aproximadamente 12,88 g de placebo y 7,728 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato en matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Agregar 70 mL de solución solvente y sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (Concentración Clorhexidina Acetato: 0,077 mg/ml).

Tabla 15. Resultados obtenidos en estudio de exactitud.

Concentración (mg/mL)	Nivel (%)	Área (μV^*s)	Concentración obtenida (mg/mL)	Recuperabilidad individual (%)	Promedio (%)	Criterio de aceptación	Conclusión		
0,0517	80%	2409673	0,0508	98,3	98%	98% - 102%	Cumple		
0,0517		2409540	0,0508	98,3					
0,0516		2402970	0,0507	98,2					
0,0648	100%	3028704	0,0639	98,6	99%		98% - 102%	Cumple	
0,0647		3024390	0,0638	98,6					
0,0647		3031526	0,0639	98,8					
0,0779	120%	3632166	0,0766	98,3	98%			98% - 102%	Cumple
0,0777		3628804	0,0765	98,5					
0,0778		3626072	0,0765	98,3					

10.7 Rango

Si los resultados de la linealidad, precisión y exactitud cumplen el criterio de aceptación, el rango de la concentración de la muestra se establece entre el 80 y el 120 % de la concentración objetivo (el 100% corresponde a 0,064 mg/ml de Clorhexidina acetato por mL).

Conclusión: Cumple.

10.8 Estabilidad

La estabilidad de las preparaciones de Clorhexidina se determina comparando el área del peak de las preparaciones a diferentes tiempos y condiciones, con el área del peak de las preparaciones a $t=0$. En $t=0$, la concentración relativa inicial se considera como 100%.

Preparaciones analizadas:

Solución estándar y solución muestra.

Condiciones:

Refrigerador (2-8°C/oscuridad)

Temperatura ambiente (luz)

Temperatura ambiente (oscuridad)

Tabla 16

Preparación Estándar Clorhexidina Acetato						
Tiempo (días)	T° Ambiente/Luz		T° Ambiente/Oscuridad		Refrigerado/Oscuridad	
	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Recuperación (%)	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Recuperación (%)	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Recuperación (%)
-	3034627	100%	3034627	100%	3034627	100%
0 días	3034627	100%	3034627	100%	3034627	100%
1 día	3041204	100%	3043347	100%	3038637	100%
2 días	3038947	100%	3041825	100%	3036424	100%
3 días	3044421	100%	3046407	100%	3033270	100%
4 días	3051848	101%	3070045	101%	3050993	101%
8 días	3105628	102%	3128641	103%	3073645	101%

Tabla 17

Preparación Muestra Endogel						
Tiempo (días)	T° Ambiente/Luz		T° Ambiente/Oscuridad		Refrigerado/Oscuridad	
	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Recuperación (%)	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Recuperación (%)	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Recuperación (%)
-	2142086	100%	2142086	100%	2142086	100%
0 días	2142086	100%	2142086	100%	2142086	100%
1 día	2110081	99%	2148792	100%	2152083	100%
2 días	2090308	98%	2155615	101%	2144563	100%
3 días	2091777	98%	2152128	100%	2148491	100%
4 días	2097911	98%	2179524	102%	2165571	101%
8 días	2137854	101%	2184220	102%	2191347	102%

Criterio de aceptación: Recuperación de Clorhexidina debe estar entre 98% - 102%.

Conclusiones: La preparación Estándar Clorhexidina Acetato es estable 4 días en condiciones de ambiente/oscuridad y 8 días en condiciones ambiente/luz y refrigerado/oscuridad (98% - 102%).

Preparación muestra es estable 8 días en condiciones de ambiente/luz, ambiente/oscuridad y refrigerado/oscuridad (98% - 102%).

11 Robustez

Se evalúa la influencia de la variación de tres condiciones cromatográficas, en el System Suitability Test. Dicha evaluación se realiza a través de un análisis de varianza.

Criterio Aceptación: A partir del estudio de precisión, se calcula el intervalo de confianza para el valor medio. Los resultados obtenidos para cada parámetro deben estar dentro del intervalo de confianza (error aleatorio), para considerar que el parámetro no afecta a los resultados.

11.1 Parámetros de configuración HPLC:

11.1.1 Variación velocidad de Flujo

Tabla 18. Robustez variación de flujo: 0,8 mL/min.

Inyección	Platos teóricos (N)	Área ($\mu V*s$)	Tiempo de retención (min)	Tailing (T)
1	42935	3795843	23,7	1,4
2	42448	3789624	23,8	1,4
3	41453	3800078	23,8	1,4
4	41896	3801595	23,8	1,4
5	42813	3797354	23,8	1,4
Promedio	42309	-	-	1,4
Criterio SST	≥ 2000	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	$\leq 2,0$
RSD (%)	N/A	0,1	0,2	N/A

Tabla 19. Robustez variación de flujo: 1,2 mL/min.

Inyección	Platos teóricos (N)	Área ($\mu V*s$)	Tiempo de retención (min)	Tailing (T)
1	55877	2526288	19,5	1,3
2	55340	2532281	19,5	1,3
3	56213	2531672	19,4	1,3
4	56203	2535502	19,4	1,3
5	55902	2533163	19,4	1,3
Promedio	55907	-	-	1,3
Criterio SST	≥ 2000	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	$\leq 2,0$
RSD (%)	N/A	0,1	0,1	N/A

Figura 10. Resultados de análisis de varianza para robustez de variación velocidad de flujo.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,10705E+12	2	2,05353E+12	185509,9256	1,14451E-27	3,885293835
Dentro de los grupos	132835641,2	12	11069636,77			
Total	4,10719E+12	14				

Resultado: 185509,93 > 3,89

Conclusión: F cal > F crítico, por lo tanto, se concluye que existen diferencias significativas, por lo cual el resultado no cumple.

11.1.2 Variación temperatura de columna

Tabla 20. Robustez variación de temperatura de columna: 20°C

Inyección	Platos teóricos (N)	Área ($\mu V*s$)	Tiempo de retención (min)	Tailing (T)
1	44852	3035672	21,5	1,3
2	45076	3033109	21,4	1,3
3	44081	3036213	21,4	1,3
4	44639	3035063	21,4	1,3
5	45338	3036149	21,4	1,3
Promedio	44797	-	-	1,3
Criterio SST	≥ 2000	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	$\leq 2,0$
RSD (%)	N/A	0,0	0,1	N/A

Tabla 21. Robustez variación de temperatura de columna: 30°C

Inyección	Platos teóricos (N)	Área ($\mu V*s$)	Tiempo de retención (min)	Tailing (T)
1	56223	3041890	20,7	1,3
2	55241	3044533	20,8	1,3
3	55804	3040809	20,8	1,3
4	55793	3040976	20,8	1,3
5	55294	3046280	20,8	1,3
Promedio	55671	-	-	1,3
Criterio SST	≥ 2000	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	$\leq 2,0$
RSD (%)	N/A	0,1	0,1	N/A

Figura 11. Resultados de análisis de varianza para robustez de variación velocidad temperatura de columna.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9818801939	2	4909400969	1008,6259	4,27634E-14	3,885293835
Dentro de los grupos	58408980,8	12	4867415,067			
Total	9877210919	14				

Resultado: 1008,63 > 3,89

Conclusión: F cal > F crítico, por lo tanto, se concluye que existen diferencias significativas, por lo cual el resultado no cumple.

11.1.3 Variación de longitud de onda

Tabla 22. Robustez variación de longitud de onda a 237 nm

Inyección	Platos teóricos (N)	Área ($\mu V*s$)	Tiempo de retención (min)	Tailing (T)
1	49235	3092484	21,1	1,3
2	48397	3092045	21,1	1,3
3	48953	3095478	21,2	1,3
4	49573	3093853	21,2	1,3
5	50187	3099251	21,2	1,3
Promedio	49269	-	-	1,3
Criterio SST	≥ 2000	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	$\leq 2,0$
RSD (%)	N/A	0,1	0,2	N/A

Tabla 23. Robustez variación de longitud de onda a 241 nm

Inyección	Platos teóricos (N)	Área ($\mu V*s$)	Tiempo de retención (min)	Tailing (T)
1	49065	3058190	21,2	1,3
2	49371	3056149	21,2	1,3
3	49394	3058484	21,2	1,3
4	48910	3054698	21,1	1,3
5	48589	3056391	21,1	1,3
Promedio	49066	-	-	1,3
Criterio SST	≥ 2000	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	$\leq 2,0$
RSD (%)	N/A	0,1	0,1	N/A

Figura 12. Resultados de análisis de varianza para robustez de longitud de onda.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	30880519827	2	15440259913	2558,0549	1,642E-16	3,885293835
Dentro de los grupos	72431250,8	12	6035937,567			
Total	30952951078	14				

Resultado: 2558,05 > 3,89

Conclusión: F cal > F crítico, por lo tanto, se concluye que existen diferencias significativas, por lo cual el resultado no cumple.

12 Conclusión

Para los parámetros estudiados de validación de método: system suitability, standard check, especificidad, linealidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia, exactitud se cumple con todos los criterios de aceptación. Así también se evaluó, el estudio de estabilidad de las preparaciones y la robustez del método.

Para el parámetro de estabilidad se concluye que la solución muestra es estable 8 días, en todas las condiciones de almacenamiento estudiadas. Mientras que la solución Estándar Clorhexidina Acetato presenta una estabilidad por 4 días en condición temperatura ambiente/ oscuridad y 8 días en las otras dos condiciones de almacenamiento estudiadas (cumpliendo el criterio de recuperación 98–102%).

Para el parámetro de Robustez se observa que el método no es robusto en ninguna de las variaciones estudiadas, ya que $F_{cal} > F_{crítico}$, por lo que se concluye que existen diferencias significativas entre las variables expuestas. Por lo tanto, todas las preparaciones deben trabajarse usando solo parámetros nominales.

En base a lo expuesto, se concluye que el método de “Análisis Control de Calidad Identificación y Valoración mediante HPLC de Clorhexidina en Endogel Gel Tópico”, se encuentra validado.

13 Desviaciones

13.1 Desviaciones del protocolo.

Las desviaciones que se detallan a continuación se producen tras la ejecución del método detallado en el protocolo de validación SVP.CL01.90263 “Protocolo de estudio analítico. Validación de método analítico Identidad y valoración de Clorhexidina en Endogel, gel tópico, por HPLC” donde se observó que los cromatogramas resultantes de las preparaciones descritas en este, presentaban co-elución de peaks, lo cual se traduce en una incorrecta separación de los componentes de la formulación y por ende, la identificación y valoración de Clorhexidina no era óptima.

▪ **Condiciones instrumentales**

Las condiciones instrumentales expuestas en el punto 6 “condiciones instrumentales” del SVP.CL01.90263, fueron modificadas por las condiciones expuestas en el punto 7.1 del presente documento.

▪ **Preparación de soluciones**

Las preparaciones de soluciones expuestas en los puntos 7.1 , 7.2 , 8.3 , 8.4 y 8.6 del documento SVP.CL01.90263, fueron modificadas acorde a las preparaciones que se encuentran en los puntos 8.1 , 8.2 , 10.4 y 10.6. Se realizaron modificaciones en la preparativa de las soluciones, así como en el material utilizado. Además, se realizaron correcciones en los cálculos de concentraciones y cantidades. Los cambios mencionados, se ven reflejados en los puntos antes mencionados pertenecientes a este reporte de validación.

▪ **System Suitability**

Se realizó corrección tipográfica en los criterios de aceptación, ya que en el punto 8.1 del protocolo SVP.CL01.90263 indicaba “Clorhexidina digluconato”, cuando lo correcto en este caso es “Clorhexidina acetato”.

▪ **Especificidad**

La tabla n°6: “Fórmula cuali-cuantitativa” expuesta en el documento SVP.CL01.90263, no fue considerada en la validación ni en los cálculos realizados en esta, por presentar información incompleta.

• **Exactitud**

En el documento SVP.CL01.90263 se especifica un Criterio de aceptación, correspondiente a “El % de recuperación de la muestra individual debe estar entre el 98.0% y el 102.0% en cada nivel investigado”. Para el presente documento se realizó una modificación de este criterio, considerando que este debe ser utilizado sin decimales, quedando finalmente a “El % de

recuperación de la muestra individual debe estar entre el 98% y el 102% en cada nivel investigado”

▪ **Robustez**

Se realizó corrección del punto 8.8.1 en el protocolo SVP.CL01.90263 para estudio de robustez que indica las variaciones de los ajustes HPLC, esto debido a que las condiciones nominales fueron modificadas. Así como también, se realizó una rectificación del criterio de aceptación de este parámetro de estudio; ya que, se evaluó System Suitability Test realizando el calculo del intervalo de confianza para el valor medio donde los resultados obtenidos para cada parámetro deben estar dentro del intervalo de confianza (error aleatorio), para considerar que el parámetro no afecta a los resultados. Todo lo anteriormente mencionado se encuentra corregido en el punto 11 del presente documento.

Anexo 3. Análisis control de calidad identificación y valoración de clorhexidina digluconato en Endogel, gel tópico, mediante HPLC.

Synthon

Análisis Control de Calidad Identificación y Valoración de
Clorhexidina Digluconato en Endogel Gel Tópico por
HPLC.

Author(s): Camila Zuloaga/ Manuel Castillo

Tabla de Contenidos

1	Histórico de Cambios	3
2	Introducción	3
3	Materiales, aparatos y preparación de soluciones	3
3.1	Materiales	3
3.2	Aparatos	3
3.3	Preparación de soluciones	4
3.3.1	Fase móvil:	4
3.3.2	Preparación Estándar y Muestra	4
4	Condiciones Instrumentales	5
5	Procedimiento Analítico	6
5.1	System Suitability	6
5.2	Preparación Estándar Check	7
6	Robustez	7
7	Secuencia de Valoración	8
8	Cálculo Valoración.	9
9	Identificación Clorhexidina Digluconato: HPLC.	9
10	Evaluación	12
11	Reporte	12
12	Referencias	12

1 Histórico de Cambios

<i>Versión</i>	<i>Motivos</i>
1.0	Nuevo documento

2 Introducción

El presente método de valoración describe la metodología y los requisitos para demostrar que el método para la Identificación y Valoración de Clorhexidina en Endogel gel tópico por HPLC, el cual es adecuado para el fin previsto. La validación de este método esta descrita en SVR.CL01.92866.

3 Materiales, aparatos y preparación de soluciones**3.1 Materiales**

- Estándar de referencia Clorhexidina Acetato
- Muestra Endogel
- Fosfato de sodio monobásico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$); grado reactivo.
- Agua Milli-Q; grado HPLC.
- Trietilamina; grado reactivo.
- Ácido Ortofosfórico (85% H_3PO_4); grado reactivo.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Filtro de membrana 0,45 μm PVDF
- Filtro de Disco Millipore 0,22 μm PVDF
- Matraz volumétrico ámbar 100 ml
- Viales ámbar HPLC

3.2 Aparatos

- Balanza Analítica capaz de leer al menos 0.01 g
- HPLC
- Baño de ultrasonido
- pH-metro
- Vortex
- Agitador mecánico

3.3 Preparación de soluciones

3.3.1 Fase móvil:

Solución A Buffer Fosfato de sodio 50mM: Pesar 7,8 g de Fosfato de sodio monobásico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$) y disolver en 1000 mL de agua Milli-Q grado HPLC. Añadir 2,5 ml de Trietilamina y ajustar pH a $3,0 \pm 0,05$ con ácido fosfórico 85% y llevar a volumen usando agua Milli-Q. Filtrar la solución por filtro de membrana PVDF 0.45 μm y desgasificar en baño de ultrasonido.

Solución B: Acetonitrilo grado HPLC.

Solución Solvente: Buffer Fosfato de sodio 50 mM pH 3.0: Acetonitrilo (85:15).

3.3.2 Preparación Estándar y Muestra

Preparación Solución Estándar Clorhexidina Acetato: Pesar exactamente 6,44 mg de estándar de referencia Clorhexidina Acetato y llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL. Agregar 70 mL de solución solvente y agitar 10 minutos a 250 rpm en agitador mecánico, inmediatamente después agitar 1 minuto aprox. en vortex y llevar a volumen usando solución solvente. Posteriormente filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0,22 μm . (*Concentración de Clorhexidina acetato: 0,064 mg/ml*).

Nota: La preparación estándar es estable 4 días en condiciones de ambiente/oscuridad y 8 días en condiciones ambiente/luz y refrigerado/oscuridad.

Preparación Muestra Endogel: Realizar un pool con 10 jeringas y pesar 12.88 g de muestra, (equivalente a 12880 mg) llevar a matraz volumétrico ámbar 100 mL y agregar 70 mL de solución solvente; posteriormente sonicar en baño de ultrasonido durante 30 minutos, alternando intermitentemente agitación manual. Finalmente llevar a volumen con solución solvente y filtrar por filtro de disco Millipore PVDF 0.22 μm . (*Concentración de Clorhexidina digluconato: 0,064 mg/ml*).

Nota: La preparación muestra es estable 8 días en condiciones de ambiente/luz, ambiente/oscuridad y refrigerado/oscuridad.

Preparación System Suitability: Usar Preparación Solución Estándar Clorhexidina Acetato.

Nota: El volumen de las soluciones se puede escalar hacia arriba o hacia abajo según sea necesario.

4 Condiciones Instrumentales

Tabla 1. Condiciones cromatográficas

<i>Detector</i>	: UV
<i>Columna</i>	: Luna C18 (Phenomenex, 250 x 4.6 mm, dp=5µm)
<i>Pre - columna</i>	: Security Guard C18 (Phenomenex 4 mm x 3 mm)
<i>Solución de lavado</i>	: Isopropanol 10%
<i>Temperatura Columna</i>	: 25°C
<i>Temperatura Muestras</i>	: 25°C
<i>Velocidad de Flujo</i>	: 1.0 mL/min
<i>Volumen de Inyección</i>	: 20 µL
<i>Tiempo de corrida</i>	: 35 min
<i>Longitud de Onda</i>	: 239 nm
<i>Elución</i>	: Gradiente
<i>Fase móvil</i>	: Ver tabla 2
<i>Lavado de columna a 35°C</i>	: Ver tabla 3

Tabla 2. Gradiente fase móvil

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Solución A (Buffer Fosfato) (%)</i>	<i>Solución B (ACN) (%)</i>	<i>Flujo (ml/min)</i>
0	85	15	1.0
2	85	15	1.0
5	80	20	1.0
9	75	25	1.0
10	75	25	1.0
12	70	30	1.0
15	70	30	1.0
20	70	30	1.0
21	85	15	1.0
30	85	15	1.0
35	85	15	1.0

Tabla 3. Gradiente para lavado de columna.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Solución A (Agua Milli-Q) (%)</i>	<i>Solución B (MeOH) (%)</i>	<i>Solución C (ACN) %</i>	<i>Flujo (ml/min)</i>
1	90	10	0	1.0
30	90	10	0	1.0
31	50	50	0	1.0
45	50	50	0	1.0
46	50	0	50	1.0
60	50	0	50	1.0
61	10	0	90	1.0
70	10	0	90	1.0
71	10	0	90	0.0

5 Procedimiento Analítico

5.1 System Suitability

Se evaluará a través de 5 inyecciones de preparación estándar, descrita en el punto 3.3, de acuerdo a la siguiente tabla propuesta:

Tabla 4. Secuencia propuesta System suitability test:

<i>Nombre del Vial</i>	<i>Número de Inyecciones</i>
Solución Solvente	3
Preparación System Suitability	5
Solución Solvente	1

Tabla 5. Criterios de aceptación para SST

<i>Peak</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>RSD (t_R) (%)</i>	<i>RSD (A) (%)</i>
Clorhexidina acetato	≥ 2000	≤ 2,0	≤ 1,0	≤ 1,0

5.2 Preparación Estándar Check

Preparar en duplicado (A y B) solución estándar, tal como se describe en preparación de soluciones e inyectar dichas soluciones según la siguiente secuencia:

Tabla 6. Secuencia propuesta Estándar Check

<i>Nombre del Vial</i>	<i>Número de inyecciones</i>
Solución Solvente	3
Solución Estándar A	2
Solución Estándar B	2

Use las dos inyecciones de Std A y las dos inyecciones de Std B para el cálculo del estándar Check con la siguiente ecuación:

$$\%Recuperación = \frac{C_{std A}}{A_{std A}} \times \frac{A_{std B}}{C_{std B}} \times 100$$

Donde:

$A_{std A}$ = Área promedio Estándar A

$A_{std B}$ = Área promedio Estándar B

$C_{std A}$ = Concentración de Estándar A

$C_{std B}$ = Concentración de Estándar B

Si la recuperación no se encuentra entre 99–101%, descartar preparación estándar Check y preparar nuevamente.

6 Robustez

Se demostró que el método NO es robusto frente a las siguientes variantes en las condiciones cromatográficas:

- Velocidad de flujo
- Temperatura de la columna
- Longitud de onda

Por lo tanto, se debe trabajar usando solo valores nominales.

7 Secuencia de Valoración

Realizar dos preparaciones de muestra por lote e inyectar la preparación estándar y las preparaciones de muestra de acuerdo a la siguiente secuencia propuesta:

Tabla N°7: Secuencia propuesta Valoración

<i>Nombre del vial</i>	<i>Número de inyecciones</i>
Solución Solvente	Mínimo 3
Preparación Estándar B (Std B)	n ¹
Preparación muestra Valoración 1 (Lote x, Preparación 1)	1
Solución Solvente	Mínimo 3
Preparación muestra Valoración 2 (Lote x, Preparación 2)	1
Solución Solvente	Mínimo 3
Preparación Estándar B (Std B)	n ¹

Calcular el promedio y RSD % del Std B en toda la secuencia ($n \geq 3$)¹. Si el RSD % es superior al 2% se debe investigar la causa para prevenir una posible reincidencia del problema a futuro y reinyectar preparación estándar y muestra.

Importante: No alterar las 3 inyecciones mínimo de solución solvente en secuencia ya que esto evita carry over provocado por excipiente Methocel.

¹ Donde (n) es igual al número de inyecciones de Std B o Std A. Al menos tres inyecciones del estándar se requieren para determinar un % RSD sobre toda la secuencia. Por lo tanto, el estándar se puede medir por duplicado durante toda la secuencia o las mediciones del estándar Check pueden ser utilizadas.

8 Cálculo Valoración.

Promediar las áreas respectivas y proceder al cálculo de la concentración de clorhexidina digluconato, según la siguiente fórmula:

$$\% CHX = \frac{A_{mta}}{A_{std}} \times \frac{P_{std}}{100} \times \frac{Pot_{std}}{100} \times \frac{100}{P_{mta}} \times \frac{M_{glu}}{M_{act}} \times 100$$

Donde:

- A_{mta} = Área promedio de las inyecciones en la Solución Muestra
- A_{std} = Área promedio de las inyecciones de la Solución Estándar de Clorhexidina Acetato
- P_{std} = Peso Estándar Clorhexidina acetato (mg)
- POT_{std} = Potencia Estándar Clorhexidina acetato
- P_{mta} = Peso muestra (Endogel) (mg)
- C_{std} = Concentración de Clorhexidina acetato en la Solución estándar
- C_{mta} = Concentración de Clorhexidina digluconato en la Solución muestra
- M_{glu} = Peso molecular de Clorhexidina digluconato (897,76 g/mol)
- M_{act} = Peso molecular de Clorhexidina acetato (625,55 g/mol)

9 Identificación Clorhexidina Digluconato: HPLC.

Identificar el peak principal en la preparación muestra (lote x, peso 1) comparando el tiempo de retención con el del peak de CHX en el cronograma de la preparación estándar al 100%.

Figura 1. Cromatograma preparación estándar Clorhexidina acetato.

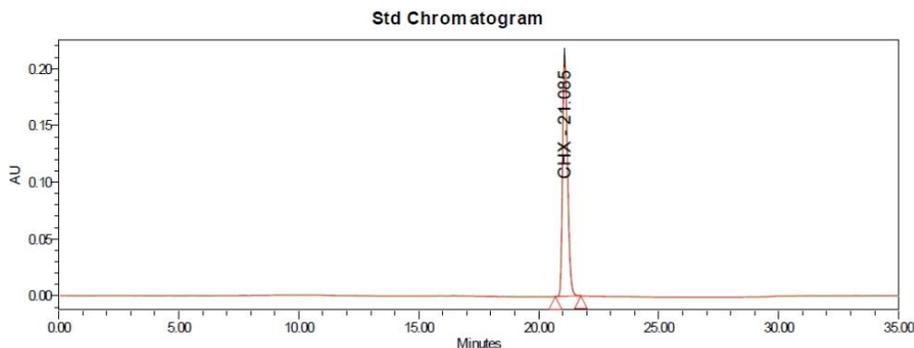


Figura 2. Cromatograma preparación muestra Endogel.

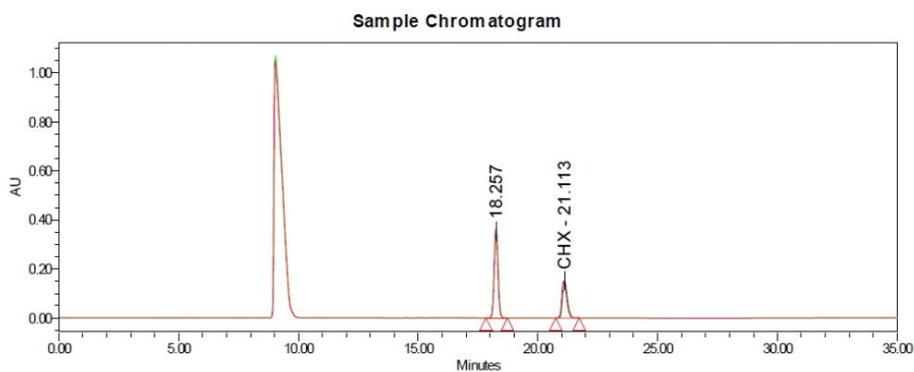


Figura 3. Cromatograma preparación Placebo cargado para identificación peak Lidocaína.

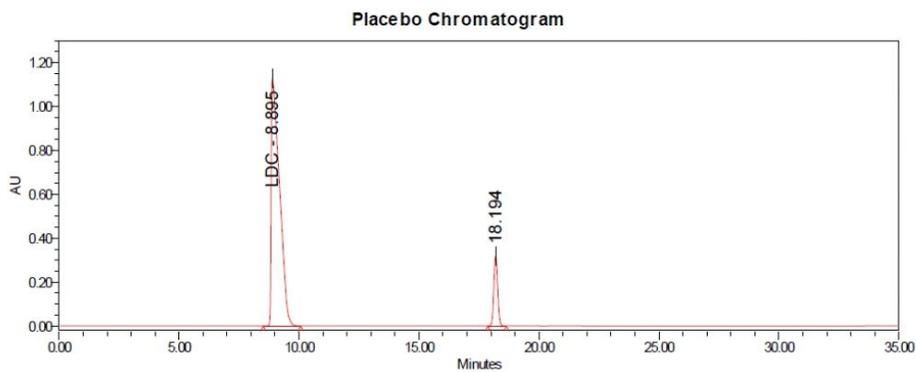


Figura 4. Cromatograma preparación excipiente Propilparabeno para identificación de peak.

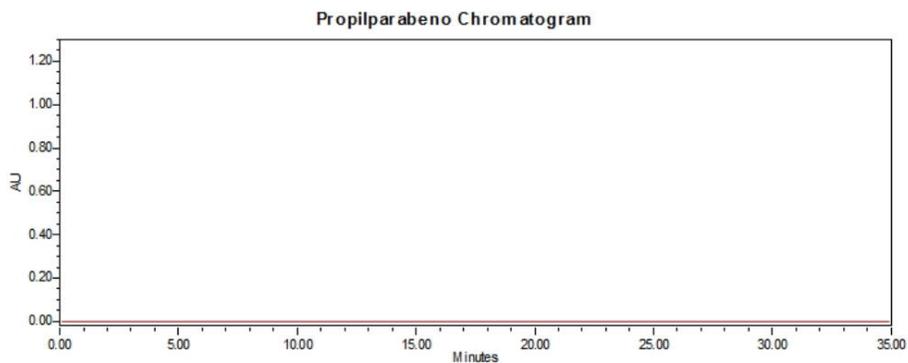


Figura 5. Cromatograma preparación excipiente Metilparabeno para identificación de peak.

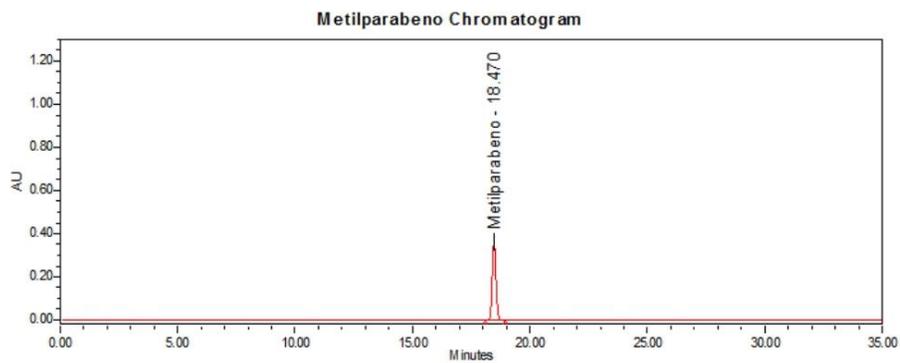
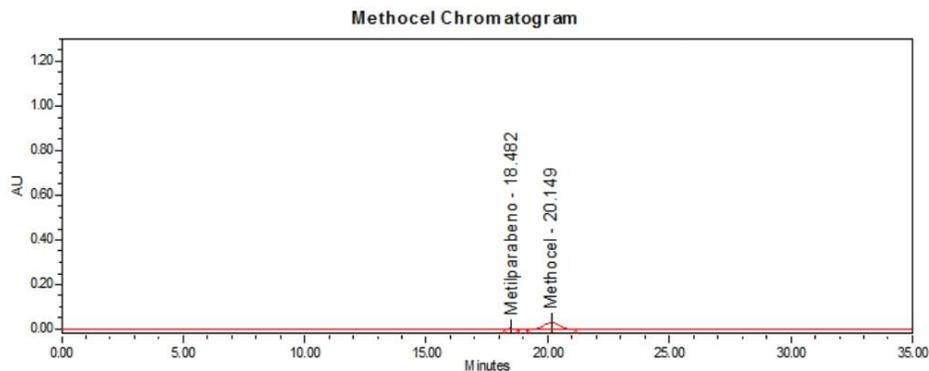


Figura 6. Cromatograma preparación excipiente Methocel para identificación de peak.



10 Evaluación

Identificar y calcular la concentración del analito, para cada preparación, redondeando con el mismo número de decimales que figuran en la especificación. Comprobar que estas se cumplen para cada preparación. Si el resultado está fuera de especificación, realizar una investigación.

11 Reporte

Identificar y calcular la concentración del analito, de cada lote, usando exactitud completa de los resultados de todas las preparaciones.

Hoja de resultados: Informar la concentración promedio de cada analito, redondeando al mismo número de decimales que figura en la especificación.

Certificado de análisis: Informar la concentración promedio de cada analito, redondeando al mismo número de decimales que figura en la especificación.

12 Referencias

-SVR.CL01.92866 Reporte de Validación. Identidad y Valoración de Clorhexidina en Endogel, gel tópico, por HPLC