



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ DESARROLLO FARMACEUTICO DE TABLETAS DE TOLBUTAMIDA ”



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :

JAVIER VILLALBA ESTRADA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pag.
I. Introducción y objetivos	1
II. Generalidades:	
A) Monografía de tolbutamida	4
B) Tabletas	8
C) Disolución	18
D) Cromatografía de líquidos de alta resolución (C.L.A.R.)	25
III. Material y equipo	37
IV. Parte experimental. Formulaciones:	
A) Proceso de fabricación de las tabletas de tolbutamida	39
B) Método basado en la USP XX para estudiar la velocidad de disolución de las tabletas de tolbutamida	39
C) Estudio de algunos factores de la formulación que afectan la disolución de tabletas de tolbutamida	41
V. Parte experimental. Desarrollo analítico:	
A) Desarrollo del método analítico	60
B) Método analítico de las tabletas de tolbutamida	66
C) Validación del método analítico	69
VI. Discusión de resultados	94
VII. Conclusiones	103

VIII. Apéndices

105

IX. Bibliografía

108

I. INTRODUCCION

Y

OBJETIVOS

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Actualmente la diabetes mellitus presenta un alto índice de morbilidad en la población mexicana, encontrándose en todas las edades.

Así lo indica un estudio epidemiológico realizado por el IMSS. De 4,933 personas mayores de 10 años, 113 tenían diabetes, lo cual representa una tasa de incidencia de 23 -- por 1,000. Otro estudio estadístico efectuado en 24 entidades federativas mostró que 263 personas eran diabéticas, de éstas, 113 de sexo femenino y 150 de sexo masculino [1] .

Empero, el índice de diabetes aumenta año con año y algunos de los factores causantes son: la excesiva ingestión de carbohidratos, obesidad, factores hereditarios, etc.

La diabetes mellitus es una enfermedad causada por la alteración en el metabolismo de la glucosa. Esta alteración se debe a la insuficiente secreción de insulina, la cual es sintetizada en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Al disminuir la secreción de ésta hormona origina hiperglucemia y glucosuria (aumento de la concentración de glucosa en sangre y orina respectivamente), polidipsia -- (sed exagerada), polifagia (hambre exagerada) y agotamiento. Los signos característicos de diabetes son hiperglucemia y glucosuria, los cuales son revelados por análisis clínico.

El tratamiento médico del diabético se realiza mediante:

- 1.- Dieta pobre en azúcar y grasas.
- 2.- Dosificación de insulina zinc-protamina.

3.- Administración de fármacos hipoglucemiantes. Estos se clasifican en:

- a) Biguanidas: buformina, fenformina y metformina.
- b) Sulfonilureas: acetohexamida, clorpropamida, tolazamida y tolbutamida. La acción farmacológica de estos fármacos -- consiste en la estimulación de -- las células β para secretar insulina al torrente sanguíneo [2] .

Para coadyuvar en la solventación de la problemática -- actual de la diabetes, se desarrolló una formulación a base de tolbutamida empleando una tecnología asequible, que incrementa su producción, reduciendo tiempo y costo de manufactura de ésta forma farmacéutica, alcanzando la calidad requerida al mismo tiempo.

También gracias a los avances en la instrumentación -- analítica se desarrolló una técnica de cuantificación confiable, útil tanto para el control de calidad de éstas tabletas, como para el estudio de estabilidad.

El presente trabajo experimental está constituido en -- dos partes:

- A) El desarrollo de la formulación.
- B) El desarrollo y validación de un método analítico -- por cromatografía de líquidos de alta resolución -- para cuantificar tolbutamida en las tabletas des--rolladas.

II. GENERALIDADES

A) MONOGRAFIA DE TOLBUTAMIDA [3,4] .

Nombre químico : 1-butil-3-(p-tolilsulfonil) urea.

Fórmula condensada : $C_{12} H_{18} N_2 O_3 S$

Fórmula desarrollada :



Peso molecular : 270.35

Constantes de disociación :

$^{\circ}C$	pKa
25	5.43
37.5	5.32

Descripción : Polvo blanco, cristalino e inodoro.

Punto de fusión : 126 - 132 $^{\circ}C$.

Solubilidad : Insoluble en agua. Soluble en 10 partes de etanol al 95%, en 3 partes de acetona y en soluciones de hidróxidos alcalinos y de ácidos minerales.

Identificación :

a) Espectro infrarrojo : El espectro I.R. de tolbutamida -- exhibe bandas de absorción característicos a 3320, 2920, 1700, 1600, 1500, 1460, 1335 y 815 cm^{-1} (fig. No. 1).

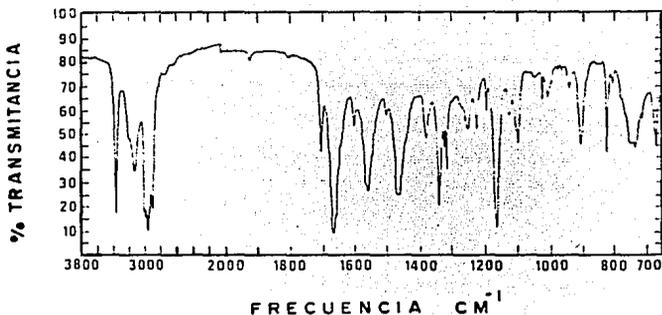


FIGURA 1 ESPECTRO INFRARROJO DE TOLBUTAMIDA

b) Espectro Ultravioleta : El espectro U.V. de tolbutamida - de una solución de 15 µg/ml en etanol anhidro presenta una máxima absorbancia a 228 nm (fig. No. 2).

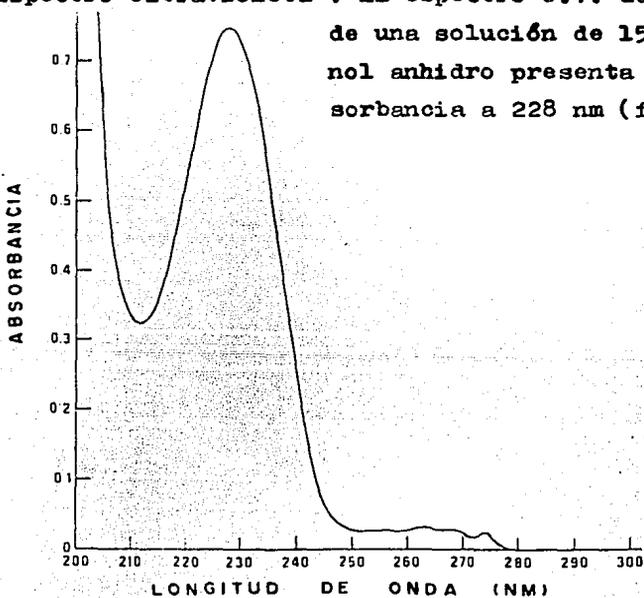


FIGURA 2 ESPECTRO ULTRAVIOLETA DE TOLBUTAMIDA

Pérdida al secado : No será mayor del 0.5% de su peso.
 Metales pesados : No más de 20 ppm.
 Selenio : No más de 30 ppm.
 Residuo de ignición : No más del 0.1% .

Estabilidad : Bottari y Mannelli [5] realizaron estudios de estabilidad de tolbutamida en 12 alcoholes primarios y en polietilenglicol 400 a 80°C. Observaron que en estos excipientes sufría descomposición; los productos de degradación identificados fueron butilamina y p-toluensulfonilisocianato.

Un reporte de Chubb y Simmons [6] indica que la tolbutamida reacciona con metanol en reflujo formando butilamina y la sal del metil-p-tolil-sulfonilcarbamato. La reacción de degradación que se lleva a cabo la atribuyeron al mecanismo de reacción denominado metanólisis.

Bottari y colaboradores [7] concluyen en su reporte que en agua, alcoholes y aminas, la solvólisis fué el mecanismo de reacción de degradación de las sulfonilureas a bajas temperaturas.

Mecanismo de acción: la acción primaria de la tolbutamida es la estimulación del tejido celular pancreático, específicamente en las células β , para secretar insulina. Hellman y colaboradores en 1971 [2] concluyeron que la tolbutamida tiene acción extracelular y no es necesario que se introduzca para estimular la liberación espontánea de insulina.

Absorción : Todas las sulfonilureas son absorbidas en el -- tracto gastrointestinal. La tolbutamida aparece en sangre a los 30 minutos, después de una administración oral y alcanza la concentración máxima entre 3 y 5 horas. Este fármaco se une a proteínas plasmáticas [2] .

Metabolismo : En el humano, la degradación de la tolbutamida se lleva a cabo mediante la reacción de oxidación en el grupo metilo, obteniéndose como principal metabolito 1-butil-3-p-carboxifensulfonilurea (carboxitolbutamida) [8] . Este metabolito es muy soluble en todo rango de pH y su solubilidad aumenta con el incremento de pH y es excretada rápidamente en orina.

Farmacocinética y toxicidad : En el humano, la vida media de una dosis única de 1 g de tolbutamida es de 5.7 hrs [9] .

La dosis letal media DL_{50} de la tolbutamida -- administrada oralmente en ratas es de 2.34 mg -- por Kg de peso y en ratón, por vía intraperitoneal de 1.232 mg/Kg.

Uso terapéutico : Sólo debe emplearse en individuos con diabetes del tipo iniciado en la madurez que no pueden o no desean administrarse insulina, si fracasa el control dietético y de reducción de peso -- [2] .

Contraindicaciones : Diabetes juvenil, coma diabético y en -- el embarazo.

B) TABLETAS

1) Definición, ventajas y atributos [10,11] .

Las tabletas son formas farmacéuticas sólidas dosificadas, manufacturadas por compresión, a partir de sustancias cristalinas, polvos amorfos o material granular, los cuales pueden ser comprimidos directamente o en combinación con --- excipientes.

En la actualidad es una de las presentaciones farmacéuticas de mayor uso, por las innumerables ventajas que presentan, por ejemplo:

- 1.- Precisión en la dosificación.
- 2.- Estabilidad física y química por periodos prolongados de almacenamiento.
- 3.- Facilidad de administración.
- 4.- Simplicidad y economía.
- 5.- Facilidad de transporte y manejo por el paciente.

Las tabletas han sido empleadas durante muchos años y éstas reciben el nombre según la vía de administración o -- bien por alguna característica en particular por ejemplo: tabletas masticables, sublinguales, bucales, vaginales, efervescentes, implantación subcutánea, etc.

Una tableta debe poseer los siguientes atributos:

- a.- Estabilidad física y química.
- b.- Capacidad de liberar al fármaco (s) en forma predecible y reproducible.
- c.- Estar libre de defectos, tales como bordes desgastados, laminación, contaminación microbiológica, - etc.

d.- Capacidad para soportar la manipulación durante el acondicionamiento, transporte, distribución en el mercado y uso.

2) Excipientes. [10,12,13] .

Los excipientes que generalmente se utilizan en formulaciones de tabletas se clasifican de acuerdo a su función - en:

A).- Excipientes que imparten características satisfactorias a las tabletas durante el proceso de compresión, son los siguientes:

A.1).- Diluentes.

A.2).- Aglutinantes.

A.3).- Lubricantes.

B).- Excipientes auxiliares que imparten características físicas adicionales a la tableta:

B.1).- Desintegrantes.

B.2).- Tensioactivos.

B.3).- Colorantes.

B.4).- Saborizantes y edulcorantes.

A.1).- Diluentes.

Los diluentes son excipientes que se adicionan en la formulación para incrementar el volumen de la tableta, a un tamaño conveniente para la compresión. Generalmente se usan cuando la dosis de algunos fármacos es muy pequeña (p.e. 0.75 mg de dexametasona/tableta), consecuentemente es necesario adicionar una sustancia inerte para que incre

mente el volumen de la tableta. Estos se seleccionan en base a la experimentación, factores de estabilidad, atoxicidad, compresibilidad y costo, ejemplos: lactosa hidratada, lactosa spray dried, celulosa microcristalina (Avicel pH 101 o 102), - almidón de maíz, manitol, etc.

A.2).- Aglutinantes.

El aglutinante tiene la función de impartir cohesividad entre el fármaco (s) y el resto de los excipientes para dar origen a granulados - compresibles. En algunas formulaciones son adicionados en seco, mezclados con los fármacos y demás excipientes y posteriormente son activados por la adición de una sustancia (p.e. agua, alcohol etílico). En otras formulaciones estos son disueltos o suspendidos en un líquido y en esta forma es adicionada a la mezcla de polvos para llevar a cabo el proceso de granulación, ejemplos: pasta de almidón, soluciones de grenetina, de carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona (PVP), acacia, alginato de sodio, polietilenglicol, etc.

A.3).- Lubricantes.

El lubricante dependiendo de la función -- que desempeña, se clasifica en:

A.3.1) Deslizante: son compuestos químicos que imparten fluidez al granulado mediante la reducción de la fricción interparticular, -- ejemplos: almidón de maíz, talco.

- A.3.2) **Antiadherente:** substancia química que evita la adherencia del comprimido en punzones y matrices, ejemplos: talco, almidón de maíz, estearato de magnesio o de calcio, sílica coloidal (CAB-O-SIL).
- A.3.3) **Lubricante:** compuesto químico cuya función es reducir la fricción entre punzón y matriz y entre la pared metálica de la matriz y el borde de la tableta, durante el ciclo de expulsión de las tabletas, evitando el despestillamiento de éstas, ejemplos: estearato de magnesio, ácido estéarico.

Usualmente estos compuestos son adicionados en el último paso de fabricación, antes de la compresión.

El tipo de lubricante, así como la cantidad a utilizar en la formulación dependerá de las características de los demás componentes de la formulación, de su compatibilidad física, química y biofarmacéutica y del proceso de manufactura.

B.1).- Desintegrantes.

El desintegrante es una substancia química cuyo objetivo es romper la tableta en un medio líquido, venciendo las fuerzas de cohesión debidas a la compresión y al aglutinante. El desintegrante al estar en contacto con dicho medio absorbe agua, esto hace que incremente su volumen, provo-

cando la fragmentación de la tableta en gránulos y partículas. Es recomendable adicionar el desintegrante en dos partes, una dentro del granulado y la otra a la mezcla final de polvos antes de su compresión, para que él que está fuera del granulado induzca el rompimiento de la tableta en gránulos y él que está dentro de éstos gránulos, --- los fragmente en partículas, lo cual favoreciera la disolución del (los) fármaco (s) porque tendrán una mayor superficie de contacto con dicho medio, ejemplos: almidón de maíz y su derivado, el glicolato sódico de almidón (Primojel); derivados de celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, --- celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona de enlace cruzado (PVP-XL), etc.

B.2).- Tensioactivos.

La función de estos compuestos radica en disminuir la tensión superficial de un disolvente -- (p.e. agua) con el fin de facilitar la humectación del fármaco, para su disolución y posterior absorción.

Los tensioactivos se caracterizan por tener una porción hidrofóbica (cadena hidrocarbonada) y una hidrofílica (sulfato, sulfonato, amino, polialcoholes, etc). Se clasifican de acuerdo a su polaridad en:

B.2.1) Tensioactivos aniónicos: se caracterizan --

por poseer un grupo polar capaz de ionizarse en solución acuosa, adquiriendo una carga eléctrica, ejemplos: laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio, etc.

B.2.2) Tensioactivos catiónicos: se caracterizan por tener un grupo polar capaz de ionizarse en solución acuosa, adquiriendo una carga eléctrica positiva, ejemplos: derivados de amonio cuaternario, el bromuro de cetiltrimetilamonio.

B.2.3) Tensioactivos anfóteros: se caracterizan por presentar en el grupo polar hidrofílico un grupo aniónico y un catiónico, ejemplo: -- lecitinas.

B.2.4) Tensioactivos no iónicos: son compuestos químicos constituidos por una cadena hidrocarbonada lineal o cíclica con 1 o más grupos oxidrilos (OH), ejemplos: alcohol laurico, alcohol cetílico, alcohol estearílico, monopalmitato de sorbitan (Span 40), monopalmitato de sorbitan polioxietileno 20 (Tween 40), etc.

B.3).- Colorantes.

Estos se emplean para proporcionar una apariencia estética al producto final y facilitar la identificación de cada producto. Comúnmente estos se añaden en la formulación, disueltos en --

en la solución aglutinante o mezclados en una porción de diluyente y posteriormente incorporarlo al resto de polvos, mezclando hasta su homogenización. Los colorantes empleados pertenecerán a la clase denominada "Alimentos, Medicamentos y Cosméticos" (A.M.C.) porque deben ser atóxicos y no -- carcinogénicos.

B.4).- Saborizantes y edulcorantes.

Los saborizantes son útiles en el mejoramiento del sabor de tabletas masticables y de uso pediátrico.

Generalmente son aceites volátiles, estos -- se disuelven en alcohol y se adicionan al granulado, aunque también pueden ser absorbidos en otros en otros excipientes (talco) e incorporarse antes de la compresión; algunos actúan a la vez como -- lubricantes.

Los edulcorantes son los que imparten el -- sabor dulce a las tabletas masticables, ejemplos: manitol, lactosa, sacarina, sacarosa, dextrosa, -- aspartame, etc.

3) Métodos de manufactura [10,11,13] .

Los métodos utilizados en la preparación de tabletas - son los siguientes:

- a) Compresión directa.
- b) Doble compresión o granulacion en seco.
- c) Granulación húmeda.
- d) Granulación directa.

a) Compresión directa.

Este método consiste en comprimir la mezcla de fármaco (s) con excipientes compresibles, tales como celulosa microcristalina, etc. Este compuesto tiene las características de fluidez y compresibilidad.

Las etapas en que esta constituido este método son: - pesado, tamizado, mezclado y compresión.

Su ventaja principal es la reducción del costo de manufactura porque requiere de poco espacio, tiempo y equipo.

b) Doble compresión o granulacion en seco.

El método consiste en compactar una mezcla de polvos - en unidades de peso mayor de las tabletas que finalmente se obtendrán. Dichas unidades son molidas y tamizadas -- para dar el tamaño de gránulo, se adiciona el lubricante, se mezcla y comprimir para obtener las tabletas deseadas.

Las etapas en que está constituido son: pesado, tamizado (formación de gránulos),mezclado y compresión.

Ventaja: es un método de fabricación opcional cuando - al (los) fármaco (s) es (son) sensibles a la humedad y al calor.

Desventaja: requiere de mayor tiempo, manipulación y de equipo especial (compactador de polvos).

c) Granulación húmeda.

Este método es ampliamente utilizado en la manufactura de tabletas. Consiste en humedecer la mezcla de polvos con una solución aglutinante, proporcionando cohesividad a los componentes de la formulación (fármaco y excipientes), obteniéndose un granulado húmedo, este se seca en horno y ya seco se tamiza, mezcla con el lubricante y se comprime.

Los pasos que comprende este proceso son: pesado, tamizado, granulación (solución aglutinante), tamizado, secado, tamizado, mezclado (lubricante) y compresión.

Ventaja: tiene la certidumbre que mediante este procedimiento se obtienen gránulos con buena compresibilidad.

Desventajas: debido al número de pasos de que está -- constituido, requiere mayor tiempo de manufactura, consumo de energía, equipo y materiales. Este método es inconveniente cuando el fármaco es lábil a la humedad y temperatura.

d) Granulación directa.

Este método fué propuesto por Rubinstein [14] .

El fundamento de éste método consiste en llevar a cabo la granulación mediante el uso de un compuesto químico -- que funde a temperaturas relativamente bajas, por ejemplo ácido esteárico, polietilenglicol 6,000, etc. Al fundir, este compuesto se dispersa alrededor de las partículas --

que lo rodean, uniendolas entre sí y al ir descendiendo - la temperatura, solidifica dando origen a la formación - del granulado.

Las etapas en que esta formado son: pesado, tamizado, mezclado, granulación (calentamiento progresivo hasta que funda el agente granulador y después un lento enfriamiento hasta que dicha mezcla alcance la temperatura ambiente) tamizado y compresión.

Ventajas: reduce costos y tiempo de fabricación de - tabletas porque no requiere la etapa de secado.

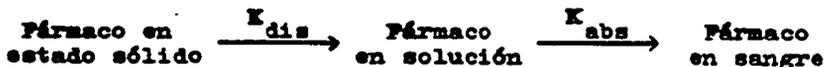
C) DISOLUCION [12,15] .

1) Importancia de la prueba de disolución.

Hasta hace algunos años se consideraba que la prueba de desintegración era el medio de evaluación "in vitro" de la biodisponibilidad de los fármacos en tabletas. En un principio se asumía que existía una correlación entre el rompimiento de la tableta en pequeños fragmentos y la disolución del fármaco.

Sin embargo hoy en día, la prueba de desintegración no asegura de que se liberarán dichos fármacos. Schroeter, Tingstad, Knoechel y Wagner [15] reportaron que en algunas formulaciones de tabletas si existía una relación cuantitativa entre la velocidad de disolución y el tiempo de desintegración. Pero en otras no había tal relación, por lo consiguiente no es el parámetro adecuado para evaluar la biodisponibilidad de los fármacos en tabletas.

Cuando un fármaco es administrado en forma de tableta, cápsula, suspensión oral, suspensión inyectable, pellet, etc. la velocidad de absorción dependerá de la rapidez de la disolución del fármaco en los fluidos biológicos según el sitio de absorción. En este caso, la velocidad de disolución es el paso limitante de la velocidad de absorción, ésto se observa en el siguiente esquema:



Donde K_{dis} y K_{abs} representan las constantes de velocidad de disolución y absorción respectivamente.

Los procesos involucrados cuando una tableta es expuesta en el flúido gastrointestinal, después de su administración oral se indican en la fig. No. 3. En donde se observa que la disolución no ocurre solamente a partir de las partículas, sino que también de la misma tableta y de aquellos fragmentos originados por la desintegración.

El fármaco al estar en solución (paso No. 3) se absorbe rápidamente hasta alcanzar la máxima concentración plasmática (paso No. 4), para llevar a cabo el efecto terapéutico determinado.

Se ha visto que las velocidades de desintegración y disolución dependen básicamente de la formulación y del método de manufactura de las tabletas. Por eso el formulador debe controlar estos parámetros al desarrollar una nueva formulación para que ésta sea biodisponible, siendo su herramienta la prueba de disolución.

La importancia de correlacionar la prueba de disolución "in vitro" con la velocidad de absorción "in vivo", es una de las preocupaciones actuales del formulador. Esta relación la obtiene al realizar estudios de biodisponibilidad del nuevo producto farmacéutico en pacientes, determinando la máxima concentración del fármaco (s) en plasma, orina, etc. y al efectuar la disolución "in vitro" de éste producto cuantificando el porcentaje (%) o cantidad (mg) de fármaco en solución, a intervalos de tiempo.

La prueba de disolución es importante para fármacos que son insolubles o ligeramente solubles en agua y cuya vía

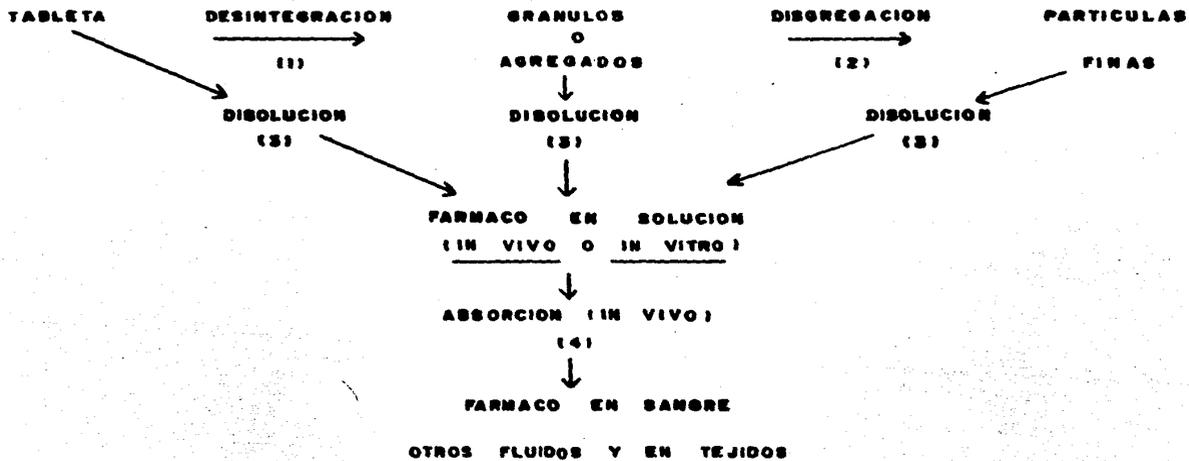


FIGURA No. 3

de absorción se lleva a cabo en el tracto gastrointestinal y también para aquellos fármacos cuyas dosis son muy pequeñas (p.e. 0.75 mg de dexametasona/tableta) y en productos de acción sostenida.

2) TEORIA DE LA DISOLUCION [13] .

Durante el desarrollo de una formulación de tabletas el formulador debe verificar que el (los) fármaco (s) se libere (n) de ellas, al estar en contacto con el fluido gastrointestinal. Una vez que esté en solución, esta listo para ser absorbido y llegar así al sitio de acción en donde va a ejercer el efecto terapéutico deseado.

Es por esto, que la disolución es un proceso fundamental desde el punto de vista biofarmacéutico. Para evaluar la disolución se recurre a pruebas "in vitro", porque indican con buen margen de seguridad la posible biodisponibilidad del fármaco en estudio.

La prueba de disolución "in vitro" debe demostrar que:

- a.- La disolución del fármaco de su forma farmacéutica está dentro de las especificaciones establecidas según el producto.
- b.- La velocidad de disolución sea uniforme de tableta a tableta , de lote a lote y ser la misma de aquellos lotes que resultaron ser biodisponibles y clínicamente efectivos.

Existen diversas teorías que tratan de explicar este proceso. Una de las más conocida es la teoría de la película o del film, propuesta por Noyes y Whitney, la cual se ---

expresa por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = K \frac{D S}{v h} (C_s - C_t)$$

donde:

- $\frac{dC}{dt}$ = velocidad de disolución del fármaco.
 K = constante de velocidad de disolución.
 D = coeficiente de difusión.
 S = área superficial de los sólidos a disolverse.
 v = volumen del medio de disolución.
 h = espesor del estrato estacionario.
 C_s = concentración del fármaco en el estrato estacionario.
 C_t = concentración del fármaco en el medio de disolución a un tiempo t .

Esta ecuación establece que al estar en contacto una tableta con su medio de disolución, se forma un estrato estacionario de solución saturada del fármaco con un espesor (h) alrededor de la tableta. La disolución de este fármaco se lleva a cabo por difusión de las moléculas del fármaco de dicho estrato hacia el resto del medio de disolución.

Es decir, la velocidad de disolución de un fármaco - esta en función de: el espesor (h) del estrato estacionario, la velocidad de difusión (D) de las moléculas del fármaco - en el estrato hacia el seno del medio, al área superficial - (S) del fármaco y a su solubilidad en el mismo.

3) Factores que alteran la velocidad de disolución en la prueba "in vitro" [15] .

Existen muchos factores que afectan la velocidad de -- disolución de fármacos contenidos en tabletas, estos se clasifican de la siguiente forma;

a.- Factores inherentes a la prueba de disolución:

a.1) Composición del medio de disolución, pH, fuerza iónica, viscosidad, tensión superficial, etc.

a.2) Velocidad de agitación.

a.3) Temperatura del medio de disolución.

a.4) Gradiente de concentración entre el estrato saturado alrededor de la tableta y el resto del medio de disolución.

a.5) Geometría del recipiente de prueba.

b.- Factores relacionados con las propiedades físico-químicas del fármaco mismo:

b.1) Polimorfismo.

b.2) Solubilidad.

b.3) Solvatación.

b.4) Complejación.

b.5) Tamaño de partícula.

c.- Factores relacionados a la formulación:

c.1) Cantidad , tipo y método de incorporación de los excipientes: diluyente, desintegrante, aglutinante, lubricante, etc.

c.2) Procedimiento de manufactura: compresión directa, doble compresión, granulación húmeda, etc.

- c.3) Tamaño y distribución del gránulo.
- c.4) Fuerza y velocidad de compresión.
- c.5) Tipo de recubrimiento; entérico, etc.

d.- Factores ambientales:

- d.1) Humedad durante el proceso de manufactura.
- d.2) Condiciones de almacenamiento del producto terminado (temperatura, humedad relativa, etc.).
- d.3) Tiempo de almacenamiento.

D) CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (C.L.A.R.)

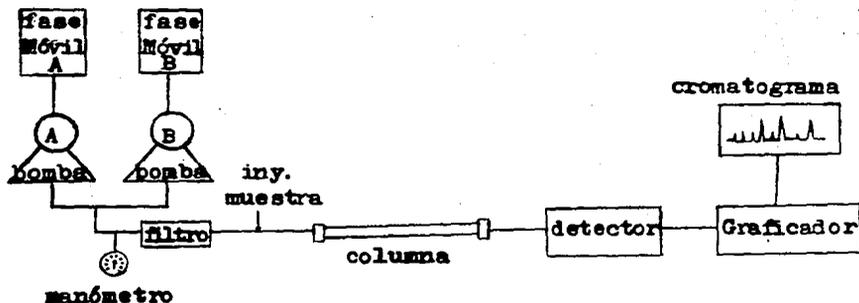
[16,17,18,19]

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es la técnica de separación mediante la cual, se lleva a -- cabo el reparto de un soluto (s) entre una fase móvil y una estacionaria. Cada soluto eluye en la columna en un tiempo de retención (t_R) determinado, para ser posteriormente detectado, graficado y cuantificado.

El equipo básico de cromatografía de líquidos es el -- siguiente:

- a.- Bomba.
- b.- Fase móvil.
- c.- Manómetro.
- d.- Columna cromatográfica (Fase estacionaria).
- e.- Detector.
- f.- Registrador de datos (Graficador).

Esquema de un cromatógrafo de líquidos:



a.- Bomba: para realizar un análisis por C.L.A.R. es fundamental que la fase móvil posea un flujo y una presión constante a través de la columna, para que se lleve a cabo la elución de los solutos de una muestra en un tiempo determinado y esto se logra mediante el uso de una bomba cromatográfica adecuada.

Las bombas se clasifican en aquellas que impulsan la fase móvil a un flujo constante y aquellas que la impulsan a presión constante.

Las bombas más utilizadas son la de flujo constante:

1.- Bombas reciprocantes.

2.- Bombas de desplazamiento positivo.

1.- Bombas reciprocantes: están constituidas por cámaras de pequeños volúmenes (35-400 μ l) con pistones reciprocantes o diafragmas flexibles, que impulsan la fase móvil dentro de la columna en contra de la presión que opone el material de empaque de esta misma. Algunas de estas bombas constan de mecanismos especiales para minimizar la variación de la de la pulsación del flujo y a su vez proporcionan una línea basal estable.

2.- Bombas de desplazamiento positivo: su mecanismo de operación es semejante a una jeringa, cuyo émbolo es impulsado por un tornillo sin fin, el que a su vez es controlado por un motor. Impulsan un flujo constante sin pulsaciones, independientemente de la presión que opone la columna.

b.- Fase móvil: es el componente del sistema cromatográfico que realiza el proceso de elución de los solutos en la muestra por analizar, mediante la interacción con la fase estacionaria.

La selección de la fase móvil depende básicamente de varios parámetros tales como:

- 1) Pureza de los disolventes.
- 2) Solubilidad de la muestra en la fase móvil.
- 3) Estabilidad de la muestra en la fase móvil.
- 4) Compatibilidad entre la fase móvil, muestra y detector.
- 5) Miscibilidad con la fase estacionaria.
- 6) pH.
- 7) Polaridad, de acuerdo al tipo de cromatografía empleada, ya sea de fase normal o de fase inversa - (se describirán posteriormente) y también a la polaridad del fármaco en estudio. Ejemplos de fases móviles en orden creciente de polaridad: hexano, tetracloruro de carbono, tolueno, cloroformo, dicloro-etileno, 2-nitropropano, nitrometano, acetato de etilo, acetonitrilo, etanol, metanol, ácido acético y agua.

c.- Manómetro: en C.L.A.R. una de las condiciones operativas importante de trabajo, es la presión adecuada de la fase móvil a través de todo el equipo cromatográfico.

Las presiones requeridas para que la fase móvil lleve a cabo la elución de los solutos, están en función al tamaño

de partícula de la fase estacionaria, al diámetro interno de la columna y a la viscosidad de la fase móvil principalmente.

La presión, no excederá los límites de presión establecidos por el fabricante de las columnas. Al rebasar los límites, se corre el riesgo de desempaquetar el relleno de la columna, consecuentemente ésta disminuye su eficiencia. Por lo tanto, el equipo cromatográfico debe de contar con un manómetro, que indique la presión del flujo de la fase móvil - antes de entrar a la columna. Aproximadamente los límites de presión a las que se debe operar son:

- 1.- Columnas de acero inoxidable hasta 3,500 psi.
- 2.- Cartuchos radial-PAK hasta 2,000 psi.
- 3.- Columnas de vidrio hasta 1,500 psi.

d.- Columna cromatográfica.

La columna es el "corazón" del cromatógrafo, ya que en ella se realiza la separación individual de los solutos en - una muestra determinada, gracias a la interacción entre las fases móvil y estacionaria.

d-1.- Fase estacionaria.

La fase estacionaria en C.L.A.R. generalmente -- está constituida por sólidos empaquetados homogeneamente dentro de la columna. Estos sólidos difieren en --- estructura y composición química, por ejemplo:

- a) Material poroso: tierras diatomáceas.
- b) Material semiporoso: partículas cuyo centro es un - sólido (vidrio) recubiertas por una fina capa superficial porosa de sílice, por ejemplo el Zipax de ---

Dupont y el Corasil de Waters. Estas partículas poseen la ventaja de presentar una rápida transferencia de masa y además son estables a presiones elevadas.

En cromatografía de líquidos existe un tipo especial de fase estacionaria denominada "fase enlazada". Esta consiste en un compuesto orgánico de naturaleza polar o apolar unido (enlazado) al oxidrilo (OH) localizados en la superficie de las partículas de sílice mediante la reacción de silanización. Esta reacción se lleva a cabo entre los grupos oxidrilos (OH) del sílice y una solución al 10 % de octadeciltriclororosilano o al 10 % de feniltriclorosilano en tolueno [20] .

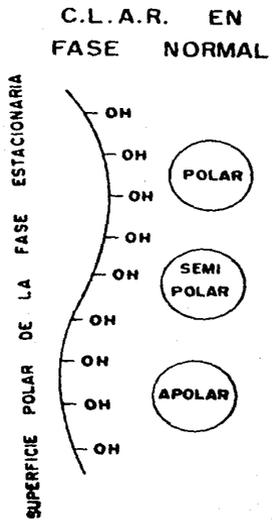
Según la naturaleza polar de la fase estacionaria enlazada, la cromatografía de líquidos se clasifica en:

1.- Fase Normal.

2.- Fase inversa.

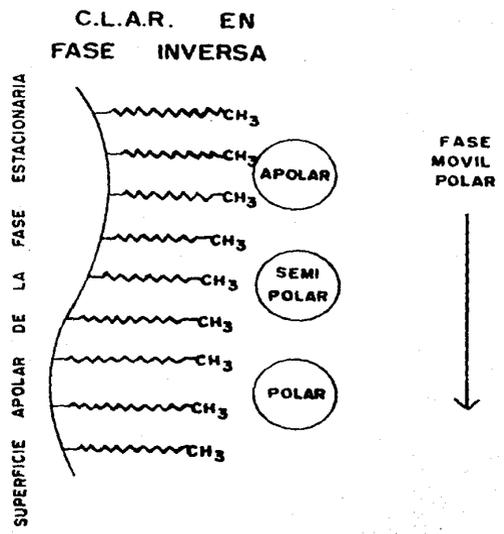
1.- C.L.A.R. en fase normal: ésta constituida por una fase estacionaria de naturaleza polar, ejemplo: sílice-OH y la fase móvil de carácter apolar, ejemplo: hexano, THF, etc.

En este tipo de cromatografía el orden de elución de los solutos está en función de la afinidad de éstos por la fase estacionaria de naturaleza polar, es decir, primero eluirá el soluto apolar, en seguida el semipolar y en último lugar el soluto polar (fig. No. 4).



FASE MOVIL APOLAR

↓



FASE MOVIL POLAR

↓

FIGURA No. 4

2.- C.L.A.R. en fase inversa: ésta cromatografía -- está compuesta por una fase estacionaria de naturaleza apolar (octadecilsililo, fenilsililo, etc) y una fase móvil de carácter polar (agua, metanol, etc.).

Aquí, el orden de elución es primeramente el soluto polar, en segundo lugar el semipolar y en último lugar el soluto apolar (fig. No. 4).

e.- Detector.

El éxito de la técnica analítica por C.L.A.R. depende en gran parte del uso de detectores altamente sensibles, porque se emplean volúmenes pequeños de muestra, -- para el análisis cuantitativo de fármacos en diversas -- formas farmacéuticas dosificadas.

La elección del detector esta en función de las propiedades físico-químicas de los solutos, p.e. longitud de onda de máxima absorbancia (λ), índice de refracción, etc.

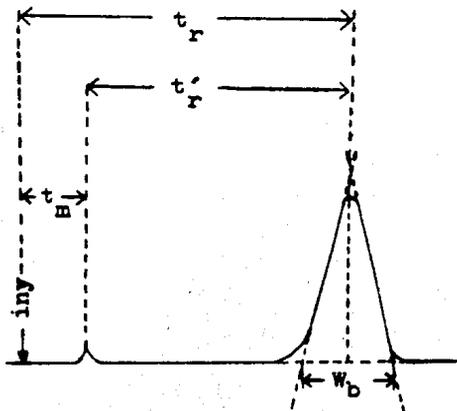
El detector más utilizado en C.L.A.R. es el de absor**u** bancia al U.V., provistos algunos de ellos de longitud de onda variable entre 190-800 nm, lo cual, lo hace útil para la cuantificación de un amplio número de fármacos.

El detector óptico funciona de la siguiente forma:

En primer instancia éste, está formado por una micro celda (aproximadamente de 10 μ l) y un rayo de luz según la longitud de onda (λ) específica del soluto (s). El rayo de luz atraviesa a la microcelda y los solutos --

eluidos al pasar por ésta, originan variaciones en la intensidad de corriente, debido a que una parte es absorbida por dichos solutos de la muestra. Estas variaciones de intensidad producen una señal, la que es recibida por el registrador de datos y este a su vez transmite la información al graficador, el cual imprime en el papel cromatográfico los picos cromatográficos con sus respectivos tiempos de retención (t_r) y áreas para cada uno de los solutos presentes en la muestra.

Los componentes más importantes de un pico cromatográfico se indican en el siguiente típico cromatograma:



donde :

t_m = tiempo muerto. Es el tiempo que transcurre en aparecer el pico correspondiente al disolvente de la muestra.

t_r = tiempo de retención. Es el tiempo que permanece retenido el soluto en la columna y comprende desde el momento de la inyección de la muestra hasta la aparición del máximo del pico del soluto en un tiempo t en minutos (min).

t_r' = tiempo de retención corregido. Es la diferencia de t_r y t_m .

W_b = ancho de la base del pico cromatográfico. Esta se obtiene trazando tangentes en los puntos de inflexión del pico y midiendo la longitud de la línea base que está comprendida entre los puntos donde la cortan dichas tangentes.

El pico cromatográfico corresponde de manera ideal a una curva de distribución normal. Dicha curva se caracteriza por su desviación estándar (σ) y su área es proporcional a la concentración del soluto en la muestra.

Para cuantificar fármacos por C.L.A.R. es indispensable que los picos estén perfectamente delineados y resueltos (separados). Esta separación se expresa mediante el factor de resolución (R_s) y hay resolución cuando es mayor o igual a 1.5 .

R_s se expresa como el cociente entre la distancia de los puntos máximos de los picos 1 y 2 y el promedio de

la amplitud de la base de los mismos, su expresión matemática es la siguiente:

$$R_s = \frac{t'_{r2} - t'_{r1}}{1/2 (W_{b1} + W_{b2})}$$

Por otra parte, éste factor de resolución está relacionado con otros parámetros cromatográficos, los cuales se expresan en la siguiente ecuación:

$$R_s = \left[\frac{N}{4} \right] \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{K'}{K' + 1} \right]$$

donde:

N = número de platos teóricos.

α = Factor de separación.

K' = Factor de capacidad

Número de platos teóricos (N). Un plato teórico es un concepto ficticio que no corresponde a ninguna entidad -- real de la columna, pero para fines de evaluación en cromatografía, se define como la parte de la columna que proporciona un efluente en equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Su expresión es:

$$N = 16 \left[\frac{t'_{r1}}{W_{b1}} \right]^2$$

donde:

N = Número de platos teóricos.

t'_{r1} = tiempo de retención del soluto 1.

W_{b1} = ancho de la base del pico cromatográfico.

Factor de separación (α) : describe la posición relativa entre dos picos adyacentes y se calcula mediante la expresión matemática:

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

Factor de capacidad o relación de capacidad (K') : expresa numéricamente la capacidad de separar un soluto del disolvente y de sus impurezas.

$$K' = \frac{t'_{r1}}{t_m}$$

III. MATERIAL Y EQUIPO

A) FORMULACIONES Y DISOLUCION :

- a.- Mezcladora Hobbart enchaquetada.
- b.- Tamiz No. 30 .
- c.- Tableteadora Manesty de 16 punzones.
- d.- Probador de dureza Schleuniger.
- e.- Friabilizador USP.
- f.- Desintegrador USP.
- g.- Disolutor Hanson Research modelo 72-R1.
- h.- Espectrofótometro Beckman.
- i.- Gradilla metálica.
- j.- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- k.- Pipetas volumétricas de 1 y 2 ml.
- l.- Matraces volumétricos de 50 y 100 ml.
- m.- Papel filtro Watman No. 41.
- n.- Jeringas hipodérmicas de 5 ml.
- o.- Termómetro de -10 a 140 °C.
- p.- Cronómetro.

B) ANALISIS CROMATOGRAFICO :

- 1.- Balanza analítica Mettler.
- 2.- Micronizador de tabletas Janke & Kunkel.
- 3.- Tamiz No. 60.
- 4.- Baño ultrasonido Mettler.
- 5.- Agitador mecánico Shaker Wrist-Action.
- 6.- Centrífuga Beckman y tubos de centrifuga.
- 7.- Cromatógrafo de líquidos Waters modelo ALC/GPC 204.
- 8.- Columna microbondapak C₁₈ .
- 9.- Pipetas volumétricas de 2, 4 y 10 ml.
- 10.- Matraces volumétricos de 50 y 100 ml.

IV) PARTE EXPERIMENTAL

FORMULACIONES

A) Proceso de fabricación de tabletas de tolbutamida mediante el proceso "Granulación Directa".

- a.- Verificación de limpieza del equipo y área de trabajo.
- b.- Pesado y tamizado de tolbutamida y excipientes a través de malla No. 30.
- c.- Mezclar la tolbutamida, el agente granulador y demás--- excipientes hasta obtener una mezcla homogénea.
- d.- Calentar progresivamente el recipiente que contiene la mezcla de polvos e iniciar el mezclado. Cuando la temperatura alcance el punto de fusión del agente granulador, ésta se debe mantener en un lapso de 20 min para que se lleve a cabo la granulación.
Posteriormente se procede a enfriar el granulado obtenido hasta temperatura ambiente.
- e.- Comprimir en máquina tableteadora.

B) Método basado en la USP XX para estudiar la velocidad de disolución de las tabletas de tolbutamida desarrolladas.

- 1.- Pesar individualmente 6 tabletas.
- 2.- Adicionar una tableta a cada vaso del disolutor que contiene 900 ml de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 a 37 °C . Emplear un sistema de agitación a base de paletas, las cuales deben girar a 75 rpm y estar dispuestas a 2 cm del fondo del vaso.
- 3.- Tomar una alícuota de 1 ml de cada vaso a los 10, 20 y 30 min, filtrarla a través de papel Watman No. 41 y ---

recibirla en matraz volumétrico de 50 ml. Diluirla — hasta el aforo con solución amortiguadora de fosfatos — pH 7.4.

4.- Leer las absorbancias de las muestras problema y del — estándar de tolbutamida en un espectrofotómetro a 228 — nm.

5.- Graficar el % de tolbutamida disuelta contra tiempo.

B.1) Cálculo para determinar el % de tolbutamida disuelta.

Se determinó mediante la siguiente ecuación;

$$\begin{array}{l} \text{mg tolbutamida} \\ \text{disuelta} \end{array} = A_{pb} \cdot \frac{C_{st}}{A_{st}} \cdot \frac{50 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \cdot 900 \text{ ml}$$

donde:

A_{pb} = Absorbancia del problema a 228 nm.

C_{st} = Concentración del estándar de tolbutamida en mg/ml (ver apéndice A).

A_{st} = Absorbancia del estándar de tolbutamida a 228 nm.

$$\begin{array}{l} \% \text{ tolbutamida} \\ \text{disuelta} \end{array} = \frac{\text{mg de tolbutamida disuelta}}{\text{mg tolbutamida / tableta}} \cdot 100$$

TOLERANCIA: Debe disolverse no menos del 70 % de la — cantidad etiquetada de tolbutamida en ta— bletas, en 30 minutos.

- C) Estudio de algunos factores de la formulación que afectan la disolución de tabletas de tolbutamida.

En el desarrollo de las tabletas de tolbutamida, se estudiaron algunos factores de la formulación que afectan su disolución que a continuación se describen:

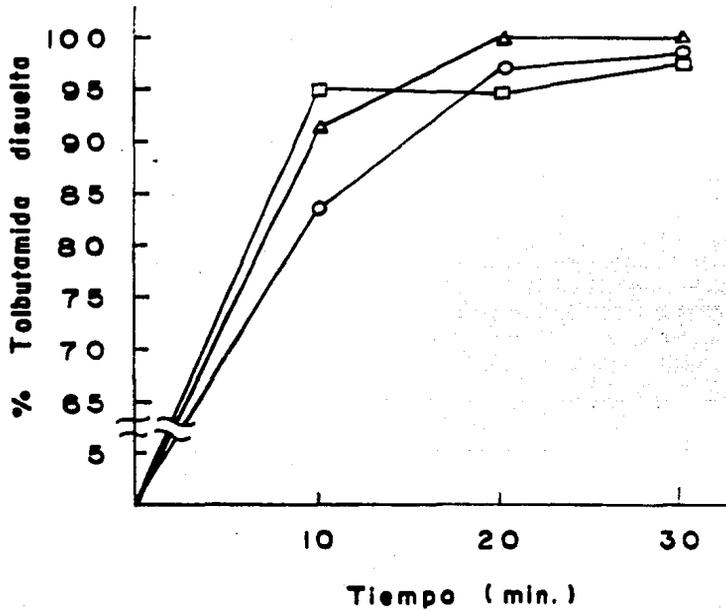
- 1) Efecto del aglutinante (agente granulador).

Utilizando el método de "Granulación Directa" se fabricaron lotes de tabletas de tolbutamida, empleando diferentes agentes granulantes para -- observar su efecto sobre la disolución (gráfica No. 1). Adicionalmente se evaluó la dureza y el tiempo de desintegración ver tabla No. 1 .

TABLA No. 1

EFFECTO DEL AGLUTINANTE EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCION DE TOLBUTAMIDA

Experimento No.	Aglutinante	Dureza (USC)	Desintegración (min)	% Tolbutamido disuelto		
				10 min	20 min	30 min
1	Acido esteárico	8.7	0.5	95.2	94.6	97.7
2	Estearato de polioxie- tileno 40	10.1	7.8	90.9	99.9	99.6
3	Poli(etileno- glicol (PEG) 6 000	10.0	6.0	83.4	97.1	98.4



Gráfica No. 1

Efecto del aglutinante en la velocidad de disolución de tolbutamida : Acido esteárico (□), Estearato de polioxietileno 40 (Δ), PEG 6000 (○).

2) Efecto de la concentración del desintegrante.

Para seleccionar la concentración óptima del desintegrante (Primojel) en la formulación se ensayaron tres concentraciones: 2, 4 y 6 % de Primojel/tableta.

La incorporación del desintegrante en las formulaciones, fué como se describió en el método de manufactura.

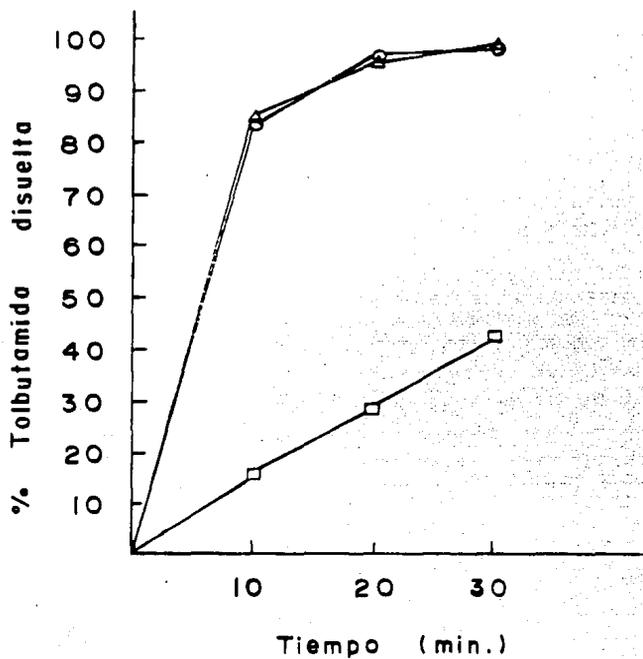
Las tabletas resultantes fueron sometidas a las pruebas de dureza, tiempo de desintegración (ver tabla No. 2) y velocidad de disolución (gráfica No. 2).

TABLA No. 2

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL DESINTEGRANTE EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCION DE TOLBUTAMIDA

Experimento No.	Primojel ^o (%P/P)	Dureza (USC)	Desintegración (min)	% Tolbutamida disuelta		
				10 min	20min	30 min
4	2.0	14.0	30.0	15.17	26.96	42.48
5	4.0	10.0	6.0	83.40	97.11	98.40
6	6.0	12.0	8.0	84.76	95.82	98.81

^o Glicolato sodico de almidón



Gráfica No. 2

Efecto de la concentración del desintegrante en la velocidad de disolución de tolbutamida primojel P/P : 2% (□), 4% (○), 6% (△).

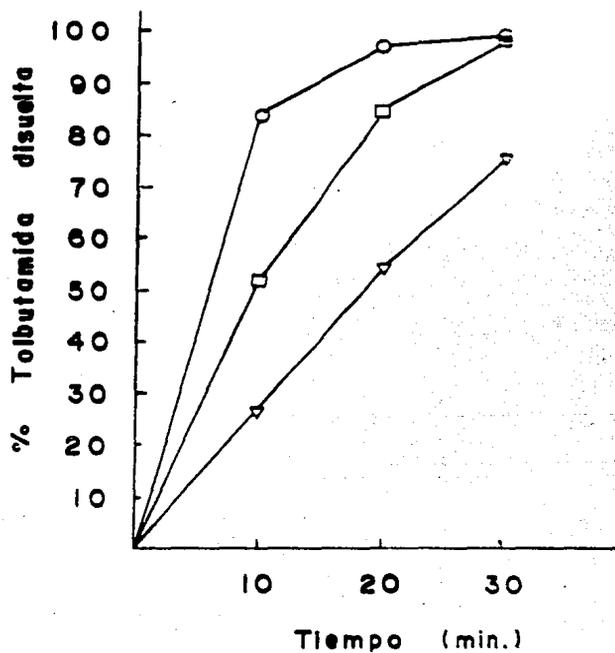
3) Efecto de la concentración del lubricante.

Los lotes de tabletas de tolbutamida se fabricaron conteniendo 0.5, 1.0 y 3.0 % de estearato de magnesio por tableta, con el fin de encontrar la concentración adecuada de este lubricante, que proporcionara fluidez al granulado y a su vez no interfiriera en la disolución del fármaco en estudio. Los resultados se muestran en la tabla No. 3 y la velocidad de disolución de tolbutamida en función del lubricante (estearato de magnesio) se indica en la gráfica No. 3 .

TABLA No. 3

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL LUBRICANTE EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCION DE TOLBUTAMIDA

Experimento No.	Estearato de magnesio. (% P/P)	Dureza (USC)	Desintegracion (min.)	% Tolbutamida disuelta		
				10 min.	20 min.	30 min.
7	0.5	10.0	6.0	83.3	97.1	98.4
8	1.0	12.6	12.3	51.7	84.7	97.9
9	3.0	8.5	25.9	26.2	53.9	75.5



Gráfica No. 3

Efecto de la concentración del lubricante en la velocidad de disolución de - tolbutamida. Estearato de magnesio p/p: 0.5 % (o) , 1 % (□) , 3 % (▽) .

4) Efecto de la relación antiadherente:lubricante.

En el desarrollo de la formulación fué necesario incluir un agente antiadherente (CAB-O-SIL) y un lubricante (estearato de magnesio), con la finalidad de evitar la adherencia del granulado en matrices y punzones y a su vez -- proporcionar un flujo adecuado a éste granulado en la máquina tableteadora. Por lo consiguiente, fué indispensable determinar la relación más apropiada de estos excipientes que satisficiera los objetivos anteriores, sin afectar la disolución de la tolbutamida.

Las relaciones ensayadas de CAB-O-SIL:estearato de magnesio fueron 0.5:0.5, 0.5:1.0 y -- 1.0:0.5 %.

Los resultados se muestran en la tabla No. 4 y la velocidad de disolución de la tolbutamida en función de la relación CAB-O-SIL:estearato de magnesio se indica en la gráfica No. 4.

TABLA No. 4

EFFECTO DE LA COMBINACION ANTIADHERENTE : LUBRICANTE EN
LA VELOCIDAD DE DISOLUCION DE TOLBUTAMIDA

Experimento No.	Relación (%) cob-o-sil : est. de Mg.	Dureza (USC)	Desintegración (min.)	% Tolbutamida disuelta		
				10 min.	20 min.	30 min.
10	0.5 / 1.0	12.0	18.0	51.5	84.6	98.3
11	0.5 / 0.5	12.0	3.0	104.8	103.0	102.6
12	1.0 / 0.5	10.0	6.0	83.4	97.1	98.4

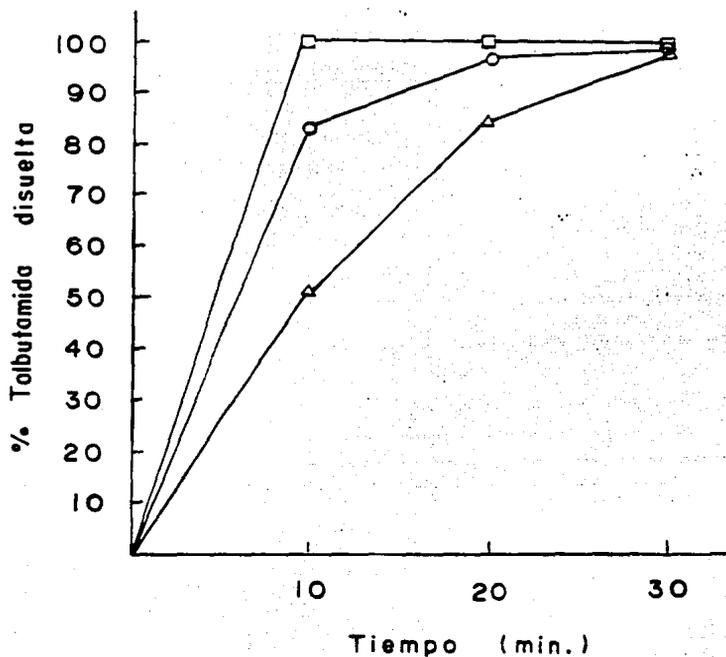


Gráfico No. 4

Efecto de la relación antiadherente : lubricante
en la velocidad de disolución de tolbutamida
CAB-O-SIL : Estearato de magnesio .
0.5 : 0.5 % (□) , 0.5 : 1.0 % (○) , 1.0 : 0.5 % (△) .

5) Efecto de la compresión.

La tolbutamida es fácilmente compresible obteniéndose tabletas blancas con buena dureza y de aspecto brillante. Para observar el efecto de la compresión en la disolución de tolbutamida, ésta se comprimó sola y combinada con --- excipientes.

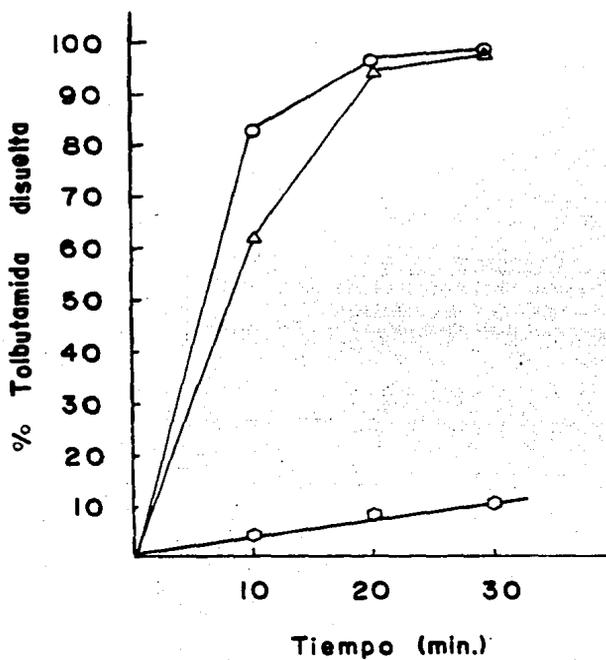
Como punto de comparación se evaluó la disolución del polvo de tolbutamida directamente.

Los resultados se muestran en la tabla y gráfica No. 5.

TABLA No. 5

EFFECTO DE LA COMPRESION EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCION DE TOLBUTAMIDA

EXPERIMENTO No.	TOLBUTAMIDA	DUREZA (USC)	DESINTEGRACION (min.)	% TOLBUTAMIDA DISUELTA		
				10 min.	20 min.	30 min.
13	SIN EXCIPIENTES	8.0	> 30	5.17	7.35	9.73
14	POLVO	-----	-----	61.81	94.05	98.50
15	CON EXCIPIENTES	10.0	6.0	83.40	97.10	98.40



Gráfica No. 5

Efecto de la compresión en la disolución de tolbutamida. Sin excipientes (O), polvo sin comprimir (Δ) y con excipientes (◊).

6) Efecto de la temperatura de almacenamiento.

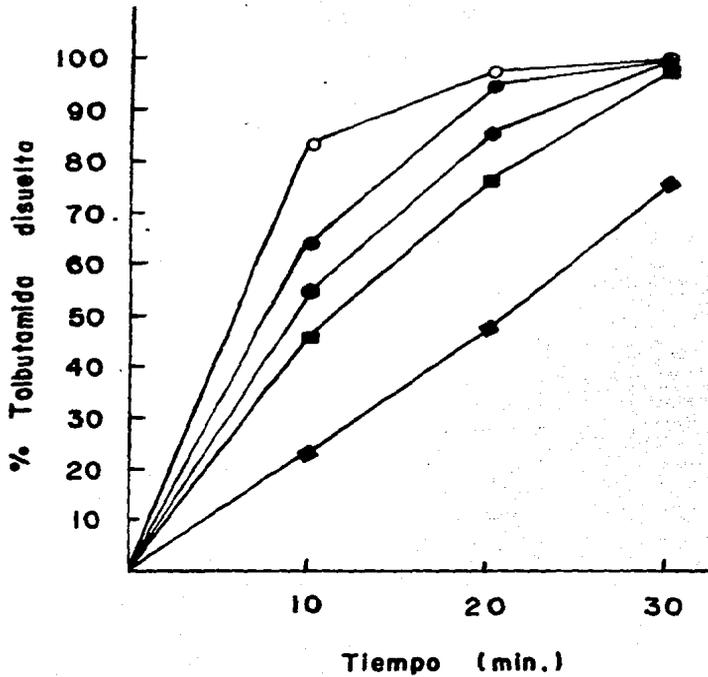
Con el fin de estudiar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la velocidad de disolución de tolbutamida, se escogió una formulación de las varias desarrolladas previamente.

Las tabletas de tolbutamida se almacenaron en frascos de vidrio ambar tipo III con tapa de hojalata. Los frascos fueron etiquetados indicando fecha, lote, temperatura de almacenamiento y se distribuyeron en estufas a 35°, 45° y 75°C. Otras muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. Al término de 14 días, se realizaron las pruebas de dureza, tiempo de desintegración y velocidad de disolución - ver tabla y gráfica No. 6.

TABLA No. 6

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO EN LA
VELOCIDAD DE DISOLUCION DE TOLBUTAMIDA**

Temperatura °C	Tiempo (días)	Dureza (USC)	Desintegración (min.)	% Tolbutamida disuelta		
				10 min.	20 min.	30 min.
Ambiente	0	10.0	6.0	83.4	97.1	98.4
Ambiente	14	10.9	5.3	64.0	94.5	100.4
35	14	11.6	12.0	54.0	85.0	100.2
45	14	7.9	16.0	45.7	76.2	98.7
75	14	6.5	23.0	23.4	46.9	74.8



Gráfica No. 6

Efecto de la temperatura de almacenamiento en la velocidad de disolución de tolbutamida :
T.A.-1 (○) ; T.A. , 14 días (●) ; 35° C , 14 días (●) , 45° C , 14 días (■) y 75° C , 14 días (◆) .

V) PARTE EXPERIMENTAL

DESARROLLO ANALITICO

A) DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR C.L.A.R. EN FASE INVERSA PARA CUANTIFICAR TOLBUTAMIDA EN TABLETAS.

Una vez seleccionada la formulación óptima, se desarrolló y validó un método analítico capaz de cuantificar en forma precisa y exacta la cantidad de tolbutamida presente en las tabletas desarrolladas.

Para llevar a cabo el desarrollo de este método, fué indispensable revisar la literatura. A continuación se delinearán algunos métodos analíticos reportados para este fármaco:

a) Método espectrofotométrico [4] :

Es aplicado para el análisis de tolbutamida en tabletas y consiste primeramente en una extracción con cloroformo, a partir de la solución cloroformica filtrada, se extrae con cuatro porciones de hidróxido de sodio 0.1 N, los extractos acuosos resultantes se acidifican con ácido clorhídrico hasta clarificación y de esta solución se vuelve extraer con cloroformo, el extracto obtenido se lee a 263 nm en un espectrofotómetro.

b) Método titulación ácido-base [4] :

Es útil para cuantificar tolbutamida como materia prima. Consiste en disolverla previamente en alcohol neutro y posteriormente titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta el vire del indicador (fenoftaléina).

c) Método colorimétrico [21] :

Splinger reportó un método para cuantificar tolbutamida en plasma, el cual consiste en la hidrólisis de este fármaco

co obteniéndose p-toluensulfonamida y n-butilamina. Este último compuesto al reaccionar con 2,4 dinitrofluorobenceno da origen a la n-butildinitroanilina, la cual es cuantificable por espectroscopía U.V.

d) Método cromatografía en capa fina [22] :

Kolasinski y colaboradores reportaron una técnica analítica cualitativa por GCP, que separa e identifica los productos de degradación de la tolbutamida (p-toluensulfonamida, dibutilurea, butilurea y n-butilamina), utilizaron como fase estacionaria a sílica gel 60f-254, fase móvil compuesta por tolueno:acetato de etilo:cloroformo y ácido acético (80:15:5:10) y como agentes reveladores: aerosol de ninhidrina al 0.2 %, una solución acuosa de hipoclorito de sodio 0.6 % v/v, solución cloroformica de fenotiazina al 1% p/v y una solución alcohólica de ácido acético al 20% v/v. El valor del r_f en este sistema para la tolbutamida es de 1.0 .

e) Método cromatografía de gases (CG) :

Tres reportes analíticos por CG indican que la cuantificación de tolbutamida por esta técnica, se lleva a cabo mediante la formación de su metil derivado, obtenido a partir de la reacción con dimetilsulfato [23] y diazometano [24] y [25] . Estos reactivos además de ser caros, para efectuar la reacción se requiere de equipo especial porque es muy delicada e involucra un tiempo considerablemente grande.

f) Método cromatografía de líquidos (CL) :

Kolasinski [22] reportó un método para cuantificar tolbutamida por CL en fase normal, sin la interferencia de sus productos de degradación, utilizando una columna de sílica gel Lichrosor Si-60, una fase móvil compuesta por etanol:tetrahidrofurano:ácido acético:hexano (4:8:0.06:87.94) un detector UV a 254 nm y prednisona como estándar interno.

La USP XXI [26] indica un método por CL en fase normal, para cuantificar tolbutamida como materia prima y como -- principio activo en tabletas. Este método emplea una fase móvil compuesta por hexano, agua saturada-hexano, THF, alcohol y ácido acético glacial (475:475:20:15:9), una -- columna empacada de sílica y como estándar interno tolbutamida.

Beyer [27] reportó un método por CL en fase inversa -- donde emplea una columna empacada de etilenpropileno al -- 1 % sobre Zipax, una fase móvil compuesta por citrato sódico amónico 0.1 M pH 4.4 en metanol a una relación 85:15 un detector UV a 254 nm y clorpropamida como estándar interno.

McGilveray [28] reportó un método por CL en fase inversa para cuantificar tolbutamida en plasma; él cual es -- específico, preciso y exacto, porque cuantifica a la tolbutamida en presencia de sus metabolitos y productos de -- degradación, empleando como fase estacionaria al octadecilsilano enlazado a sílica gel, fase móvil acetonitrilo

y formiato amónico 0.05M, a una relación 17:83, un flujo de 2.5 ml/min, detector UV a 254 nm y clorpropamida como estándar interno.

Weber [29] también reportó un método específico, preciso y exacto para cuantificar tolbutamida en plasma, por - GL en fase inversa, el cual utiliza octadecilsilano (ODS) enlazado a sílica gel (fase estacionaria), metanol:citrato sódico monobásico (fase móvil) 0.01 M en relación 30 : 70, un flujo de 0.4 ml/min y un detector UV a 254 nm.

A.1) SELECCION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

1.- FASE ESTACIONARIA.

Los artículos publicados por McGilveray y Weber - fueron fundamentales para el desarrollo de éste método, en la selección del octadecilsilano enlazado a sílica - gel como fase estacionaria, porque ellos encontraron - que ésta fase es capaz de separar tanto a la tolbutamida como a sus productos de degradación.

2.- FASE MÓVIL.

En base a las referencias bibliográficas antes citadas, se pensó en la posibilidad de simplificar la fase móvil para evitar daños en la columna (citrato de - sodio) así como disminuir costos de disolventes (metanol es más económico que el acetonitrilo). Por lo anterior, se ensayó como posible fase móvil al: metanol-ácido acético al 1% y al metanol-agua destilada, para determinar cual era la más adecuada y la relación de fase

móvil que proporcionara una óptima resolución de los picos cromatográficos de interés. Los mejores resultados se obtuvieron con la fase móvil metanol-agua destilada.

3.- DETECTOR.

También en base a la literatura consultada, a las propiedades espectrofotométricas de la tolbutamida, se decidió utilizar el detector U.V. a 254 nm, porque a -- ésta longitud de onda se tiene una respuesta lineal en un amplio rango de concentración, como se observará en el experimento "Linealidad del sistema cromatográfico".

4.- NIVEL DE CONCENTRACION DE LA TOLBUTAMIDA.

El nivel de concentración de la tolbutamida en el método se determinó escogiendo el intervalo de concentración que cumpliera con la ley de Beer, $A = abc$ donde a = coeficiente de extinción molar, b = longitud de la celda y c = concentración molar).

También se consideró la solubilidad de la tolbutamida en la fase estacionaria, porque a grandes concentraciones podría precipitar en la columna.

5.- ESTANDAR INTERNO.

Se consideraron las siguientes características:

- a) Los tiempos de retención (t_r) del estándar interno y el de la tolbutamida deberán ser diferentes.
- b) La resolución (R_s) entre los picos cromatográficos - debe ser mayor o igual a 1.5 .
- c) Concentración adecuada del estándar interno en el -- sistema cromatográfico.
- d) Costo y asequibilidad.

Se ensayó como posible estándar interno (E.I.) a: la cafeína, metilparabeno, propilparabeno, sulfanilamida, acetaminofen, benzocaina y prednisona. El seleccionado fué el propilparabeno (p-hidróxibenzoato de propilo), porque presenta una R_g mayor de 1.5 con respecto a la tolbutamida, una respuesta adecuada frente al detector UV, es asequible y económico en comparación a los demás.

6.- NIVEL DE CONCENTRACION DEL ESTANDAR INTERNO.

El nivel de concentración del estándar interno se estableció de tal forma que presentara una respuesta si milar al nivel de concentración de la tolbutamida utili zada en la técnica, frente al detector UV a 254 nm.

B) METODO ANALITICO DESARROLLADO PARA CUANTIFICAR TOLBUTAMIDA POR C.L.A.R. EN FASE INVERSA UTILIZANDO LA TECNICA "ESTANDARIZACION INTERNA" .

- 1.- Determinar el peso promedio de 10 tabletas.
- 2.- Pulverizar las tabletas.
- 3.- Tamizar el polvo a través de malla No. 60.
- 4.- Pesar por duplicado el equivalente a 250 mg de tolbutamida, transferirlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml y agregar aproximadamente 50 ml de metanol grado reactivo.
- 5.- Colocar el matraz en el agitador mecánico y agitar 10 minutos.
- 6.- Adicionar metanol hasta la marca del aforo y agitar manualmente.
- 7.- Centrifugar aproximadamente 30 ml de la solución anterior por 5 min a 2,500 rpm.
- 8.- Tomar una alícuota de 10 ml del líquido sobrenadante, depositarla en un matraz volumétrico de 50 ml. Añadir 2 ml de la solución patrón de p-hidroxibenzoato de propilo (ver apéndice B), adicionar metanol hasta el aforo y mezclar perfectamente. Rotular solución problema.
- 9.- Inyectar al cromatógrafo de líquidos 10 μ l de la solución estándar de referencia (ver apéndice B) y 10 μ l de la solución problema.
- 10.- A partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos calcular los mg de tolbutamida por tableta.

B.1) CALCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA.

Para calcular el factor de respuesta de la tolbutamida se utilizan las áreas de los picos obtenidos de la inyección de la solución estándar de referencia, así como las diluciones del estándar interno y de tolbutamida estándar expresadas en la siguiente ecuación:

$$K_{\text{tolb}} = \frac{a_{\text{tolb}}}{a_{\text{E.I.}}} \times \frac{W_{\text{E.I.}}}{100} \times \frac{2}{50} \times \frac{100}{W_{\text{tolb}}} \times \frac{50}{10}$$

donde:

K_{tolb} = Factor de respuesta de la tolbutamida.

a_{tolb} = Area del pico de la tolbutamida estándar.

$a_{\text{E.I.}}$ = Area del pico del estándar interno (p-hidroxibenzoato de propilo).

W_{tolb} = Peso de la tolbutamida en mg.

$W_{\text{E.I.}}$ = Peso del estándar interno en mg.

B.2) CALCULO DEL CONTENIDO DE TOLBUTAMIDA EN TABLETAS.

Para calcular el contenido de tolbutamida en tabletas se emplean las áreas de los picos resultantes de la inyección de la solución problema, el factor de respuesta (K_{tolb}), peso de muestra, peso promedio de las tabletas y se expresan en la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg tolbutamida}}{\text{tab}} = \frac{1}{K_{\text{tolb}}} \times \frac{a'_{\text{tolb}}}{a'_{\text{E.I.}}} \times \frac{W_{\text{E.I.}}}{100} \times \frac{2}{50} \times \frac{100}{W_s} \times \frac{50}{10} \times \text{AUW}$$

donde:

$\frac{\text{mg tol}b}{\text{tab}}$ = miligramos de tolbutamida por tableta.

$K_{\text{tol}b}$ = Factor de respuesta de la tolbutamida.

$a'_{\text{tol}b}$ = Area del pico de la tolbutamida en la solución problema.

$a'_{\text{E.I.}}$ = Area del pico del estándar interno en la solución problema.

$W_{\text{E.I.}}$ = Peso del estándar interno en mg.

W_s = Peso de la muestra en mg.

AUW = Peso promedio unitario de las tabletas en mg.

B.3) CONDICIONES CROMATOGRAFICAS DEL METODO.

- 1) Columna de 30 cm x 4 mm (D.I.) de acero inoxidable, empacada con microbondapak C_{18} (Waters Ass.) o equivalente.
- 2) Fase móvil mezcla metanol-agua destilada, filtrada y desgasificada a una relación de 55;45.
- 3) Detector UV a 254 nm.
- 4) Velocidad de flujo: 1 ml/min.
- 5) Integrador electrónico.
- 6) Volumen de inyección: 10 μ l .

B.4) REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTANDARES.

- 1) Metanol UVASOL y grado reactivo.
- 2) Solución estándar interno (ver apéndice B).
- 3) Solución estándar de referencia (ver apéndice B).

C) VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

La validación del método analítico desarrollado esta constituido por:

a) Validación del sistema cromatográfico:

En esta etapa se trabajó unicamente con estándares de tolbutamida, p-toluensulfonamida (producto de degradación de la tolbutamida) y propilparabeno (estándar interno), el cual está constituido por los siguientes experimentos:

- a.1) TOLERANCIA.
- a.2) LINEARIDAD.
- a.3) PRECISION.

b) Validación del método.

En esta segunda etapa se trabajó directamente con los placebos y tabletas de tolbutamida y está compuesto por los siguientes experimentos:

- b.1) ESPECIFICIDAD.
- b.2) LIMITES DE DETECCION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA TOLBUTAMIDA.
- b.3) DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE AGITACION PARA LA SOLUBILIZACION DE LA TOLBUTAMIDA EN TABLETAS.
- b.4) EXACTITUD.
- b.5) PRECISION.
- b.6) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

a.1) TOLERANCIA DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

En ocasiones, durante la práctica rutinaria puede variar uno o varios de los parámetros críticos del sistema, causando problemas en la cuantificación de fármacos.

Es por esto, imprescindible conocerlos de antemano - para poder controlarlos y además saber que rango de variación pueden llegar a tener, sin que afecte la confiabili-dad del análisis.

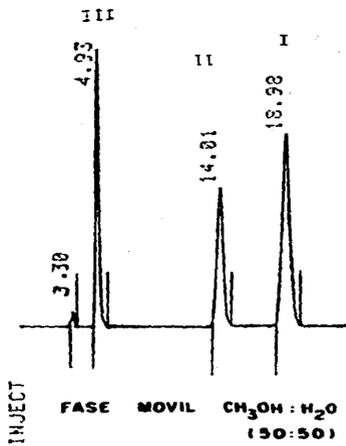
Uno de los parámetros más estudiados a este respecto es la composición de la fase móvil y su efecto sobre la resolución (R_g). Una resolución cromatográfica óptima es -- cuando R_g es mayor o igual que 1.5 .

El presente estudio tiene como fin determinar el -- efecto de la relación fase móvil (metanol:agua destilada) en la resolución de los picos correspondientes a: la tolbutamida, p-toluensulfonamida (producto de degradación de la tolbutamida) y propilparabeno (estándar interno).

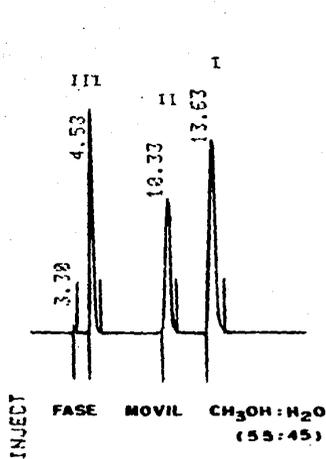
El estudio consistió en: preparar e inyectar al cro-matógrafo una solución estándar constituida por tolbutamida, p-toluensulfonamida y propilparabeno. Se ensayaron di-ferentes relaciones de fase móvil metanol:agua destilada, 50:50, 55:45 y 60:40 a un flujo de 1 ml/min. Los cro-matógramas A, B y C son los obtenidos en este ensayo y a par-tir de éstos se evaluó el grado de resolución (R_g) (ver ta-bla No. 7).

TOLERANCIA DEL SISTEMA

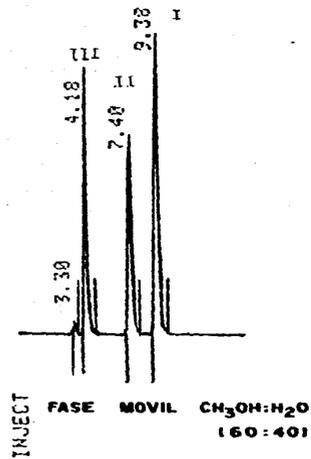
CROMATOGRAMA A



CROMATOGRAMA B



CROMATOGRAMA C



- (I)- ESTANDAR INTERNO (P-HIDROXIBENZOATO DE PROPILO ESTANDAR)
- (II)- ESTANDAR DE TOLBUTAMIDA .
- (III)- PRODUCTO DE DEGRADACION (P-TOLUENSULFONAMIDA ESTANDAR)

TABLA No. 7

TOLERANCIA DEL SISTEMA

FASE MOVIL CH ₃ OH : H ₂ O (%)	RESOLUCION (R _s) tolbutamida / estándar interno	RESOLUCION (R _s) tolbutamida / p-toluensulfonamida
50:50	3.10	7.82
55:45 *	2.85	10.91
60:40	1.92	3.6

* Procedimiento normal de análisis

$$R_s = \frac{tr_2 - tr_1}{\frac{1}{2}(wb_2 + wb_1)}$$

tr = tiempo de retención

wb = anchura de la base del pico

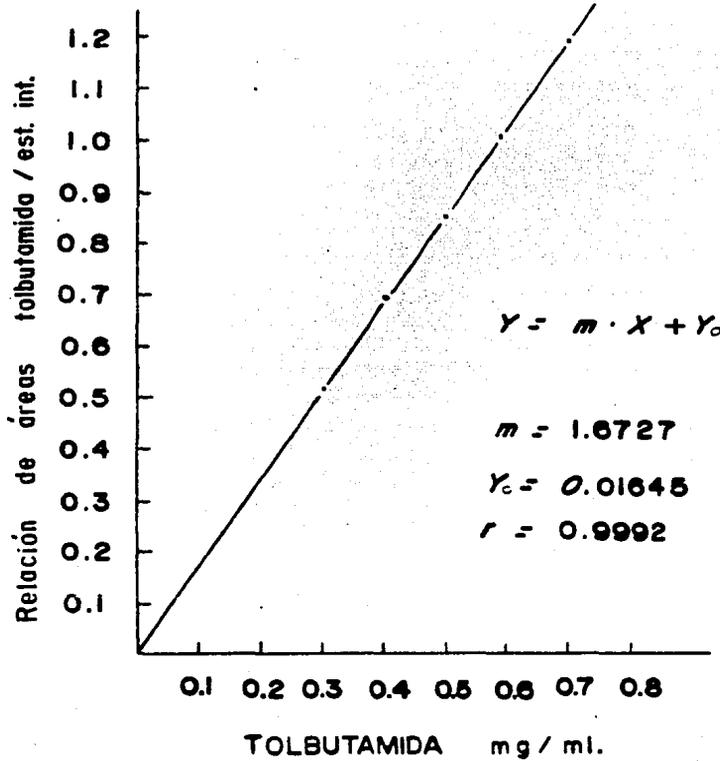
Resolución (R_s) aceptable ≥ 1.5

a.2) LINEARIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

Linearidad del sistema es una herramienta útil en cromatografía, porque indica el comportamiento de la respuesta del detector frente a cambios en la concentración del fármaco y el intervalo de concentración de éste, en el que se mantiene dicha respuesta.

La linealidad del sistema se manifestó mediante el siguiente procedimiento:

Soluciones estándar de tolbutamida en concentraciones equivalentes al 60, 80, 100, 120 y 140 % con respecto a la cantidad normal en el análisis, se inyectaron al cromatógrafo. Las relaciones de áreas obtenidas entre los picos de tolbutamida y propilparabeno se graficaron contra la concentración de tolbutamida (mg/ml) obteniéndose la gráfica No. 7.



Gráfica No. 7

Linealidad del sistema

a.3) PRECISION DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

Precisión en cromatografía es sinónimo de reproducibilidad. Es decir, que con las condiciones analíticas seleccionadas se obtienen resultados reproducibles con una desviación estándar relativa (D.E.R.) no mayor del 2 % (criterio de aceptación).

La demostración de la precisión del sistema se realizó de la siguiente forma:

Una solución estándar de referencia (ver apéndice B) se inyectó 6 veces al cromatógrafo y a partir de las áreas obtenidas y la concentración de la tolbutamida, estándar y del estándar interno, se calculó el factor de respuesta promedio de la tolbutamida (\bar{K}_{tolb}), como se muestra en la tabla No. 8 .

TABLA No. 8

PRECISION DEL SISTEMA

ESTANDAR No.	FACTOR DE RESPUESTA (K)*
1	0.033872
2	0.034400
3	0.034288
4	0.034612
5	0.034520
6	0.034360
	$\bar{K}^* = 0.034342$
	D.E. = 0.00026
	D.E.R. = 0.75 %

$$K^* = \frac{A_{\text{tolbutamido}}}{A_{\text{estándar int.}}} \times \frac{C_{\text{estándar int.}}}{C_{\text{tolbutamido}}}$$

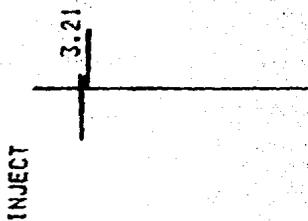
b.1) ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Es importante demostrar que un método analítico es específico, porque nos permite llevar a cabo la cuantificación del fármaco (s) con la seguridad de que este proceso se realiza sin interferencia alguna, aún estando -- presentes los excipientes u otros fármacos, así como los productos de degradación de estos.

La especificidad del método desarrollado se demostró de la siguiente forma:

Se fabricó un lote de tabletas de tolbutamida y su respectivo placebo (incluye todos los excipientes excepto el fármaco). Estas se almacenaron separadamente en frascos de vidrio ambar tipo III con tapa de hojalata a temperatura ambiente y a 75° C durante 14 días. Al término de este tiempo se realizó el análisis de las muestras, sin la adición del estándar interno, obteniéndose los cromatogramas D - G. El cromatograma H corresponde a la inyección de la solución estándar de referencia -- (ver apéndice B).

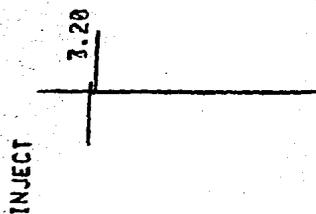
CROMATOGRAMA D.



PLACEBO

(14 DIAS A TEMP. AMB.)

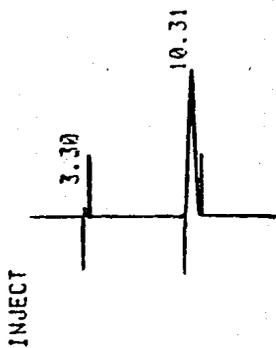
CROMATOGRAMA E



PLACEBO

(14 DIAS A 75°C)

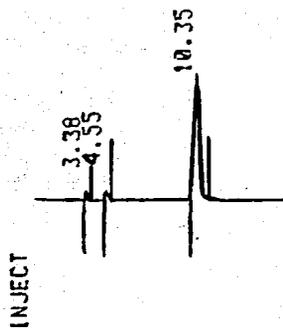
CROMATOGRAMA F



TAB. DE TOLBUTAMIDA

(14 DIAS A TEMP. AMB.)

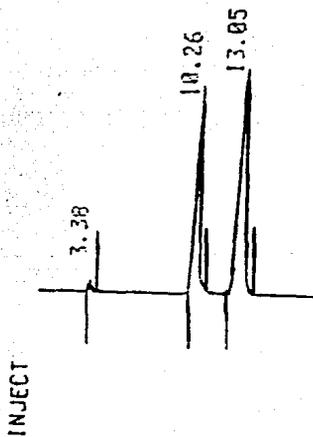
CROMATOGRAMA G



TAB. DE TOLBUTAMIDA

(14 DIAS A 75°C)

CROMATOGRAMA H



ESTANDAR DE REFERENCIA

TOLBUTAMIDA CON t_r DE 10.26 MIN.ESTANDAR INTERNO CON t_r DE 13.05 MIN.

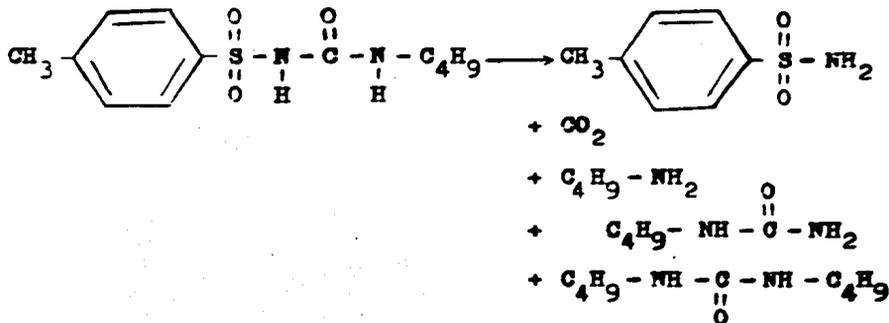
b.2) LIMITES DE DETECCION DE LOS PRODUCTOS DE
DEGRADACION DE LA TOLBUTAMIDA.

Este experimento se realizó con el fin de contestar dos preguntas:

- 1.- ¿Cual es el compuesto que aparece en el cromatograma G con un tiempo de retención t_r de 4.5 min?
- 2.- ¿Cual es la concentración mínima detectable de este compuesto por el método desarrollado?

Estas preguntas se respondieron en base a la información proporcionada en el artículo de Robertson y Kolasinski [22] y a los resultados obtenidos en el laboratorio. Estos investigadores describen que de los productos de degradación de la tolbutamida (también obtenidos en este trabajo) el único capaz de absorber luz UV a 254 nm es la p-toluensulfonamida.

Los demás productos de degradación son: la n-butilamina, butilurea y dibutilurea, los cuales no absorben luz en esta región del espectro, que a continuación se muestran en la reacción de degradación de la tolbutamida:

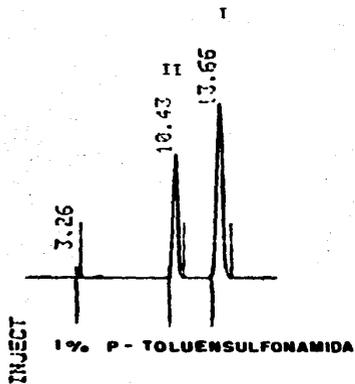


A partir de esta información se procedió a identificar que realmente la p-toluensulfonamida es el producto detectable y establecer los límites de detección de este compuesto mediante el siguiente procedimiento:

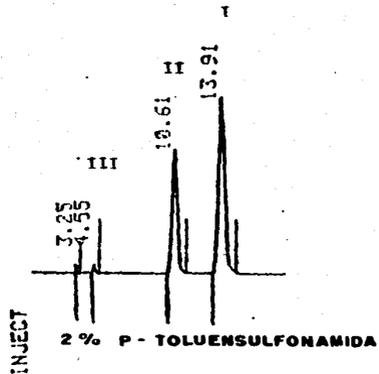
Se prepararon soluciones estándar de referencia -- (tolbutamida estándar y propilparabeno estándar) conte--niendo en ellas concentraciones equivalentes al 1, 2, 5 y 100 % de p-toluensulfonamida estándar.

Estas soluciones se inyectaron al cromatógrafo y - los tiempos de retención obtenidos se compararon con el que aparece a 4.5 min en el cromatograma G. Los cromatogramas I - L son los resultantes de este ensayo.

CROMATOGRAMA I

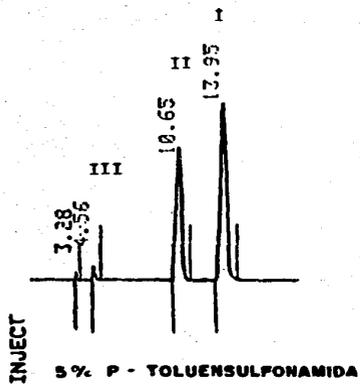


CROMATOGRAMA J

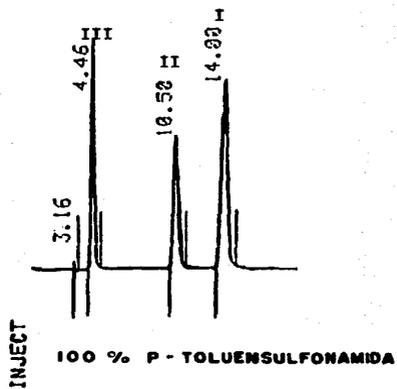


- (I) - ESTANDAR INTERNO (P-HIDROXIBENZOATO DE PROPILO ESTANDAR)
(II) - ESTANDAR DE TOLBUTAMIDA .
(III) - PRODUCTO DE DEGRADACION (P-TOLUENSULFONAMIDA ESTANDAR)

CROMATOGRAMA K



CROMATOGRAMA L



- (I) - ESTANDAR INTERNO (P - HIDROXIBENZOATO DE PROPILO ESTANDAR)
(II) - ESTANDAR DE TOLBUTAMIDA .
(III) - PRODUCTO DE DEGRADACION (P - TOLUENSULFONAMIDA ESTANDAR)

**b.3) DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE AGITACION
PARA DISOLVER LA TOLBUTAMIDA CONTENIDA EN -
TABLETAS.**

Este experimento se diseño para seleccionar el disolvente apropiado y el tiempo de agitación óptimo para disolver totalmente a la tolbutamida contenida en tabletas.

Para la selección del disolvente, primeramente se tomó en consideración la solubilidad de este fármaco hipoglucemiante, él cual es soluble en metanol, etanol, cloroformo y alcális y en segundo lugar se hicieron las siguientes consideraciones:

- 1.- El disolvente debe ser miscible con la fase móvil utilizada.
- 2.- No interferir en la cuantificación.

Los disolventes que se ensayaron fueron etanol, metanol y cloroformo. El metanol fué el que cumplió con las consideraciones arriba mencionadas.

El siguiente paso fué determinar el tiempo de agitación óptimo para solubilizar totalmente a éste fármaco. Se calculó el % de recobro de tolbutamida obtenido a los 5, 10 y 15 min de agitación de las muestras en el agitador Wrist-Action. Los resultados se muestran en la tabla No. 9 .

TABLA No. 9

TIEMPO OPTIMO DE AGITACION PARA DISOLVER TOLBUTAMIDA CONTENIDA EN LAS MUESTRAS

No. MUESTRA	% RECOBRO DE TOLBUTAMIDA			
	5 MIN. AGITACION *	10 MIN. AGITACION *	15 MIN. AGITACION *	
1	98.29	100.40	101.67	
2	100.20	99.42	100.97	
3	97.97	101.78	100.87	
	\bar{x}	98.82	100.53	101.17
	D.E.	1.205	1.185	0.435

* AGITADOR MECANICO WRIST - ACTION

b.4) EXACTITUD DEL METODO.

Hoy en día, se requieren métodos analíticos exactos que cuantifiquen la cantidad real del (los) fármaco (s) presente (s) en las formas farmacéuticas, para determinar que éstas contengan la cantidad especificada en el -
marbete.

Para demostrar que el método analítico desarrollado para cuantificar tolbutamida en tabletas es exacto, se -
realizó el siguiente experimento:

A cantidades constantes de placebo se les adicionó 60, 80, 100, 120 y 140 % de tolbutamida, con respecto a la concentración indicada en la etiqueta. Estas mues--
tras fueron tratadas como se indica en el procedimiento de análisis previamente descrito (pag. No. 67). A par--
tir de los cromatogramas resultantes se calculó el % de recobro de tolbutamida. Los resultados encontrados se -
indican en la tabla No. 10 .

TABLA No. 10

EXACTITUD DEL METODO ANALITICO

% TOLBUTAMIDA / TABLETA	TOLBUTAMIDA ADICIONADA AL PLACEBO (mg.)	RECOBRO (mg.)	% RECOBRO
60.0	300	305.8	101.93
80.0	400	405.3	101.33
100.0	500	502.6	100.52
120.0	600	601.5	100.25
140.0	700	703.2	100.46
			$\bar{X} = 100.89$
			D.E. = 0.708

b.5) PRECISION DEL METODO.

Además de que un método analítico sea específico y exacto es esencial que sea preciso. Este último requisito indica que al aplicar el método es posible obtener resultados reproducibles, aunque el análisis lo realicen dos o más químicos hoy, mañana o en un año.

La precisión de este método se demostró al realizar el siguiente experimento:

Dos químicos hicieron el análisis de 3 muestras de tolbutamida por dos días consecutivos, empleando las condiciones cromatográficas de la técnica analítica desarrollada. En total se analizaron 12 muestras, los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 11 .

TABLA No. II

PRECISION DEL METODO

DIA DEL ANALISIS	QUIMICO	MUESTRA	mg TOLB. / TAB.	% RECOBRO DE TOLB.
1 ^a	1	1	499.47	99.89
		2	504.60	100.92
		3	499.85	99.97
	2	4	502.02	100.40
		5	497.11	99.42
		6	508.91	101.78
2 ^a	1	7	491.45	98.29
		8	500.59	100.12
		9	495.01	99.00
	2	10	502.89	100.58
		11	494.40	98.88
		12	494.31	98.86
		\bar{X}	499.22	99.84
		D.E.	5.012	1.0025
		D.E.R.	1.004 %	1.004 %

b.6) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

En ocasiones una muestra no puede ser analizada el mismo día de su preparación debido a diferentes circunstancias (fallas eléctricas, descomposturas del equipo, etc.). Con el fin de conocer si dichas muestras aun - pueden ser posteriormente analizadas y dar lugar a resultados confiables, es necesario determinar bajo que - condiciones deben almacenarse y durante cuanto tiempo. Lo anterior fué determinado mediante el siguiente procedimiento:

Las soluciones metanólicas provenientes de las -- muestras de tabletas de tolbutamida, se analizaron inicialmente y éstas se guardaron en refrigeración. Al ca bo del tercer y quinto día de refrigeración se repitió el análisis y se comparó contra el obtenido inicialmente. Los resultados encontrados están reportados en la tabla No. 12 .

TABLA No. 12

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

No. MUESTRA	ANALISIS INICIAL (% TOLBUTAMIDA)	3 DIAS REFRIGERACION (% TOLBUTAMIDA)	5 DIAS REFRIGERACION (% TOLBUTAMIDA)
1	98.29	97.90	96.57
2	100.12	99.30	97.04
3	99.00	101.88	99.42
4	100.58	99.63	98.70
5	98.88	100.03	96.63
6	98.86	100.04	97.11
\bar{X}	99.28 %	99.79 %	97.57 %
D.E.	0.87	1.29	1.189
D.E.R.	0.87	1.29	1.21

VI) DISCUSION DE RESULTADOS

1) ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES DE LA FORMULACION QUE AFECTAN LA DISOLUCION DE TABLETAS DE TOLBUTAMIDA.

1.- EFECTO DEL AGLUTINANTE.

De los tres agentes granulantes ensayados en el método "Granulación Directa", el mejor fué el polietilenglicol (PEG) 6,000 , porque éste compuesto aglutinó la mezcla de polvos (tolbutamida y excipientes) para producir un granulado compresible, dando origen a tabletas con buenas características físicas y químicas y además por ser un compuesto hidrófilico favoreció la disolución de este fármaco hipoglucemiante.

No se eligió al ácido esteárico y estearato de polioxietileno 40, porque ambos dieron origen a tabletas que se adherían en punzones y matrices y éste problema sólo se resolvía con la adición de grandes concentraciones de antiadherente (CAB-O-SIL) que ocasionaron disminución en la velocidad de disolución de tolbutamida hasta niveles fuera de especificaciones.

2.- EFECTO DEL DESINTEGRANTE.

Este experimento indica, que el proceso de desintegración es un paso limitante para la disolución de estas tabletas, porque si no está presente la concentración adecuada del desintegrante, las tabletas tardarán en romperse en pequeños fragmentos y gránulos, para que se lleve a cabo la disolución de la tolbutamida, tal fué el caso del 2% de Primojel/tableta.

Espero, el 4 y 6 % de este desintegrante indujo -

el rompimiento de las tabletas en gránulos y partículas. Y a partir de éstas la tolbutamida entró en solución, cumpliendo con las especificaciones requeridas para este producto.

3.- EFECTO DEL LUBRICANTE.

Un 0.5 % de estearato de magnesio/tableta, permitió la apropiada lubricación del granulado sin afectar su disolución. El 1 % de este lubricante provocó una disminución en la velocidad de disolución de tolbutamida, únicamente al inicio (a los 10 min se disolvió 51.7 %). Pero, un 3 % de estearato de magnesio - por tableta afectó notablemente la disolución de este fármaco, obteniéndose un 26.2, 53.9 y 75.5 % en solución a los 10, 20 y 30 min respectivamente. La razón de éste decremento se atribuye a que conforme aumentamos la concentración de éste lubricante en la formulación, se crea un ambiente hidrofóbico alrededor de - de las partículas, dificultando el contacto del medio con el fármaco para que se lleve a cabo su disolución.

Por lo tanto, es recomendable no usar concentraciones de estearato de magnesio mayores del 1 %.

4.- EFECTO DE LA RELACION ANTIADHERENTE ; LUBRICANTE.

Las tres relaciones ensayadas de CAB-O-SIL:estearato de magnesio resolvieron el problema de adherencia y de flujo del granulado, pero con respecto a la disolución se encontró que la relación 0.5:0.5 %, fué la mejor, porque favoreció tanto la desintegración como la disolución de las tabletas. Sin embargo, con--

forme se incrementó en la formulación substancias hidrofóbicas como el estearato de magnesio (principalmente) y el CAB-O-SIL (sílica coloidal) disminuyó la disolución de la tolbutamida por el efecto ya mencionado en el punto anterior.

5.- EFECTO DE LA COMPRESION.

Este experimento hizo notar la importancia que tienen los excipientes en la formulación, porque al estar ausentes se observó disminución en la disolución de tolbutamida. Tal fué el caso al realizar la prueba de disolución a la tolbutamida USP en polvo, en la que se encontró una velocidad de disolución más lenta en comparación con la obtenida en las tabletas con excipientes. Al comprimir tolbutamida USP a 8 USC (sin la presencia de excipientes) las tabletas obtenidas no desintegraron dentro del tiempo especificado, alcanzando únicamente un 9.7 % en solución.

Sin embargo, al comprimir la tolbutamida USP junto con excipientes a 10 USC, las tabletas desintegraron en un tiempo promedio de 6 min y se obtuvo la disolución total de éste fármaco.

Consecuentemente la selección adecuada del tipo y cantidad de excipientes en la formulación coadyuvaron en la disolución de las tabletas de tolbutamida desarrolladas.

6.- EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO.

Las tabletas de tolbutamida almacenadas a temperatura ambiente y a 35° C no sufrieron cambios significativos en sus propiedades físicas y químicas iniciales. Empero, a 45° y 75° C se modificaron las siguientes características:

La dureza disminuyó de 10 a 6.5 USC, el tiempo de desintegración se incrementó de 6 hasta 23 minutos y la disolución disminuyó de un 98.4 a un 74.8 %.

Estos cambios probablemente se debieron a que el aumento de la temperatura provocó la disminución de la porosidad de las tabletas, consecuentemente esto ocasionó el retardamiento de la desintegración, así como la disolución de las mismas.

Por lo tanto, a partir de estos resultados obtenidos en el laboratorio se establece que este producto debe almacenarse a una temperatura no mayor de 35° para que las tabletas de tolbutamida desarrolladas conserven la calidad farmacéutica requerida.

2) VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

a.- TOLERANCIA DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

Este experimento demostró que el sistema es capaz de soportar cambios en la relación de fase móvil metanol:agua destilada de 50:50 % a 60:40 %, ya que se obtienen resoluciones R_s mayores de 1.5 entre los picos correspondientes a la tolbutamida, p-toluensulfonamida (producto de degradación de la tolbutamida) y propilp_urabeno (estándar interno).

También se observó que al aumentar el % de metanol y disminuir el % de agua destilada con respecto a la relación de fase móvil seleccionada de 55:45 % (por ejemplo 60:40%) las resoluciones tienden a ser cercanas a 1.5 y a la inversa cuando disminuye el % de metanol e incrementa el % de agua destilada (p.e. 50:50 %) se obtienen resoluciones mayores de 1.5. Sin embargo durante el análisis debe mantenerse la relación adecuada de fase móvil para que se obtengan resultados confiables, al menor tiempo posible.

b.- LINEARIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

El sistema cromatográfico desarrollado mostró que el detector presenta una respuesta lineal en el intervalo de concentración 0.3 - 0.7 mg/ml de tolbutamida y ésta se expresa en la siguiente ecuación de una línea recta:

$$Y = m X + Y_0$$

$$Y = 1.6727 X + 0.01645 \quad r = 0.9992$$

El coeficiente de correlación (r) cercano a 1 indica que hay un 99 % de confianza de que la relación de áreas entre la tolbutamida y estándar interno y el intervalo de concentración ensayado, están relacionados linealmente por la expresión matemática antes descrita.

La pendiente (m), indica el grado de sensibilidad que tiene el sistema de detectar pequeños cambios en la concentración de este fármaco en la muestra.

La ordenada al origen (Y_0), cercano a cero indica que el error experimental de la técnica es insignificante y que no interfiere en la exactitud de los resultados encontrados.

c.- PRECISION DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

El sistema cromatográfico demostró ser preciso porque se obtuvieron resultados reproducibles con respecto al factor de respuesta promedio de la tolbutamida (\bar{K}_{tolb}), con una desviación estándar relativa no mayor al límite de aceptación (D.E.R. no mayor del 2%) bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

d.- ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO.

Por medio de este experimento se demostró que el método es específico porque detecta a la tolbutamida sin la interferencia de los excipientes y productos de degradación de ambos.

e.- **LIMITES DE DETECCION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA TOLBUTAMIDA.**

La comprobación de que realmente p-toluensulfonamida es el producto de degradación de la tolbutamida - detectable por este método, fué posible al comparar - los tiempos de retención obtenidos en el cromatograma G y los correspondientes a las soluciones estándar de referencia conteniendo 1, 2, 5 y 100 % de p-toluensulfonamida, ya que estos también presentaron un tiempo - de retención de 4.5 minutos.

Además este experimento indica que el método es - capaz de detectar hasta 0.1 µg/ml (2%) de p-toluensulfonamida en la muestra.

f.- **DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE AGITACION.**

El tiempo óptimo de agitación de las muestras para disolver totalmente a la tolbutamida es de 10 minutos, ya que en este tiempo se solubiliza la cantidad - presente de este fármaco en las tabletas.

g.- **EXACTITUD DEL METODO.**

El método analítico demostró ser exacto, porque - cuantifica la cantidad real de tolbutamida contenida - en la muestra, ya que se obtuvo recobros del 100% de - la cantidad de tolbutamida adicionada a los placebos.

h.- **PRECISION DEL METODO.**

El método es preciso, porque al realizar el análisis de las tabletas por dos químicos, dos días diferentes, trabajando con las condiciones cromatográficas -

seleccionadas se obtuvieron resultados reproducibles con una desviación estándar relativa de 1%. Este dato indica que el error experimental esta dentro del límite de aceptación (no mayor del 2%) y los resultados tienen un 95 % de probabilidad de representar el valor real con un mínimo de dispersión con respecto al valor central.

i.- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Este experimento mostró que la tolbutamida permanece estable en solución metanólica por 3 días, guardadas en refrigeración y en este tiempo es factible el análisis con la plena seguridad de que se cuantifica en forma exacta la cantidad de tolbutamida contenida en dichas muestras, como si se realizara el análisis inicial.

Empero, al realizar el análisis de estas muestras a los 5 días de refrigeración se notó una disminución de la cantidad de tolbutamida, pudiendose asumir que en este tiempo sufre degradación y los resultados obtenidos no reflejan la cantidad inicial de tolbutamida presente en dichas muestras.

VII. CONCLUSIONES

VII) CONCLUSIONES

Se encontraron las condiciones óptimas para el proceso de manufactura y formulación para obtener tabletas con la calidad farmacéutica requerida y además cumplen con las especificaciones actuales solicitadas por las autoridades sanitarias mexicanas e internacionales. Así mismo, se estableció en que límites deben mantenerse -- los parámetros estudiados para lograr una adecuada disolución de la tolbutamida en las tabletas desarrolladas.

El método analítico desarrollado por C.L.A.R. en fase inversa para cuantificar el contenido de tolbutamida en estas tabletas demostró ser: específico, preciso, exacto, útil en estudios de estabilidad y en el control de calidad de éste producto. Al mismo tiempo representa una alternativa más sencilla y práctica que el método incluido en la USP XXI.

VIII. APENDICES

VIII.I) Apéndice A

Preparación de la solución estándar de tolbutamida para el método de disolución.

a) Solución patrón de tolbutamida;

Pesar con exactitud alrededor de 25 mg de - tolbutamida estándar y transferirla cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, agitar hasta disolver totalmente y aforar.

b) Solución estándar de tolbutamida;

Tomar una alícuota de 2 ml de la solución - patrón de tolbutamida y transferirla a un matraz volumétrico de 50 ml. Llevar hasta la -- marca del aforo con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 .

VIII.II) Apéndice B

Preparación de la solución estándar de referencia para el método por G.L.A.R. en fase inversa:

1) Solución patrón de tolbutamida:

Pesar con exactitud alrededor de 250 mg de tolbutamida estándar, transferirla cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y aforar con metanol absoluto.

2) Solución patrón de p-hidroxibenzoato de propilo (estándar interno) :

Pesar exactamente alrededor de 25 mg de -- p-hidroxibenzoato de propilo estándar (propilparabeno) y transferirlo a un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y aforar con metanol absoluto.

3) Solución estándar de referencia:

Tomar una alícuota de 10 ml de la solución patrón de tolbutamida y 2 ml de la solución patrón de p-hidroxibenzoato de propilo, transferirlas a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar hasta el aforo con metanol absoluto.

IX. BIBLIOGRAFIA

- [1] López Rico Arnoldo.
"Aspectos epidemiológicos de la diabetes mellitus"
Salud Pública de México. XXI : 167 (1979).
- [2] Goodman y Gilman.
Bases Farmacológicas de la Terapéutica.
Cuarta edición. Ed. Interamericana. 1281 (1976).
- [3] W.F. Beyer and E.H. Jensen.
Analytical Profiles of Drug Substances.
Florey Ed., Academic, New York, N.Y. 3, 516 (1974).
- [4] U.S.P. XX
United States Pharmacopeial Convention, Inc.
Twenty revision. 804 (1980).
- [5] Bottari, F., M. Mannelli and M.F. Saettone.
J. Pharm. Sci. 59: 1663 (1970).
- [6] Chubb, F.L. and Simmons.
Gan. J. Pharm. Sci. 7: 28 (1972).
- [7] Bottari, F., B. Giannaccini and M.F. Saettone.
J. Pharm. Sci. 61: 602 (1972).
- [8] S.S. Fajans, J.W. Conn, W.A. Struck, J.B. Wright.
J. Am. Chem. Soc. 78: 5701 (1956).
- [9] McMahon, F.G., H.L. Upjohn, O.S. Carpenter.
Current Therapeutic Research. 4: 330 (1962).

- [10] Lachman, Herbert and Lieberman.
The Theory and Practice of Industrial Pharmacy.
Lea Febiger, Second Ed. 326 (1976).
- [11] Lieberman and Leon Lachman.
Pharmaceutical Dosage Forms Tablets.
Marcel Darker Inc. New York USA. Vol. 1, 109 (1980).
- [12] Helman José.
Farmacotecnia teórica y práctica.
Ed. Continental S.A. Méx. Vol VI, 1687 (1981).
- [13] Remington's Pharmaceutical Sciences.
Mack Publishing Co. Seventeenth Ed. 653, 1603 (1985)
- [14] Rubinstein and Musikabhunna.
"Evaluation of stearic acid and polyethylene glycol
as binders for tableting potasium phenethicillin" .
Drug Development and Industrial Pharmacy. 8(2): 169
(1982).
- [15] Wagner John G.
Biopharmaceutics and Revelant Pharmacokinetics.
Drug Intelligence Publication. 18, 115 (1971).
- [16] Galen W. Ewing.
Métodos instrumentales de análisis químicos.
Ed. McGraw-Hill. 20, 411 (1978).

- [17] Connors Kenneth A.
Curso de análisis farmacéutico.
Ed. Reverté. 410 (1980).
- [18] Yost Ettore y Conlon.
Introducción a la cromatografía líquida práctica.
Perkin Elmer Corporation. 32, 74 (1980).
- [19] Snyder and J.J. Kirland.
Introduction to modern liquid chromatography.
Wiley-Interscience Ed. N.Y. (1979)
- [20] R.M. Cassidy, D.S. LeGay and R.W. Frei.
J. Pharm. Sci. 46: 340 (1974).
- [21] Springer Klin.
Wochenschr. 35: 533 (1957).
- [22] D.L. Robertson, H. Kolasinski, F.F. Matsui.
J. Pharm. Sci. 68: 577 (1979)
- [23] Sabih and Sabih.
J. Pharm. Sci. 59: 782 (1970).
- [24] J. A. Taylor.
clin. Pharmacol. Ther. 13: 710 (1972).
- [25] Midha, I.J. McGilveray and Cherette.
J. Pharm. Sci. 65: 576 (1976).

- [26] U.S.P. XXI
United States Pharmacopeial Convention, Inc.
Twenty-first revision. 1069 (1985).
- [27] William F. Beyer.
Anal. Chem. 44: 1312 (1972).
- [28] S. Sved, I.J. McGilveray and Nicole Beaudoin.
J. Pharm. Sci. 65: 1356 (1976).
- [29] Dennis J. Weber.
J. Pharm. Sci. 65: 1502 (1976).