



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "ZARAGOZA"

**"ESTUDIO DE UN METODO ANALITICO  
PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD  
DE SALBUTAMOL JARABE"**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA**

**MIGUEL CISNEROS RAMIREZ**

**PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE**

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**



MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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

A.-	SUMARIO.....	1
B.-	INTRODUCCION.....	2
1.-	FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	4
1.1.-	Propiedades de Salbutamol.....	4
1.2.-	Productos de Degradación.....	6
1.3.-	Excipientes de Salbutamol Jarabe.....	9
1.4.-	Estabilidad de Medicamentos.....	11
1.5.-	Métodos de Análisis que Indican Estabilidad.....	12
1.6.-	Criterios Estadísticos para Validación de Métodos Analíticos.....	23
2.-	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3.-	OBJETIVOS.....	30
4.-	HIPOTESIS.....	31
5.-	MATERIAL Y METODO.....	32
6.-	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	35
6.1.-	Estudio de Variables.....	35
6.1.1.-	Experimento Preliminar.....	35
6.1.2.-	Efecto de Tiempo de Reacción.....	39
6.1.3.-	Efecto de Excipientes del Jarabe.....	42

6.1.4.- Efecto de Amortiguamiento del pH.....	43
6.1.5.- Tiempo de Reacción y PH.....	45
6.1.6.- Concentración de Reactivos.....	49
6.1.7.- Concentración de Salbutamol.....	51
6.1.8.- Efecto de Productos de Degradación.....	57
6.1.9.- Detección de Productos de Degradación.....	59
6.2.- Validación del Método.....	62
6.2.1.- Linealidad.....	62
6.2.2.- Exactitud.....	68
6.2.3.- Precisión.....	69
6.2.4.- Especificidad.....	71
6.2.5.- Sensibilidad.....	71
7.- RESULTADOS.....	73
8.- CONCLUSIONES.....	77
9.- PROPUESTAS.....	79
0.- ANEXO.....	80
1.- BIBLIOGRAFIA.....	85

## SUMARIO

Con objeto de establecer una idea sobre la bondad y/o incertidumbre que proporciona un método de análisis que combina la extracción de un derivado colorido y la fotolorimetría para determinar la cantidad de salbutamol que permanece sin degradarse en una formulación de jarabe, se estudiaron los efectos del tiempo de reacción, pH, concentración de reactivos y excipientes y productos de degradación sobre la absorbancia medida. Al mismo tiempo, a través del análisis estadístico de resultados experimentales, se determinaron linealidad, exactitud y precisión del método. Este consiste en extraer con cloroformo un derivado colorido de salbutamol que se forma en fase acuosa por reacción con p-aminodimetilanilina, ferricianuro de potasio y bicarbonato de sodio, y medir la absorbancia de la fase clorofórmica a 605 nm. Se encontró que el tiempo de reacción, el pH y la concentración de reactivos si influyen en la respuesta de absorbancia obtenida; que el método presenta linealidad en el rango de 80 a 100 microgramos de salbutamol y que es exacto pero no preciso.

## INTRODUCCION

La Farmacia se ha definido como la profesión relacionada con la preparación de materiales convenientes para la prevención y tratamiento de enfermedades ( 1 ). Esto implica que el Farmacéutico debe tener, entre otros, conocimientos sobre selección, identificación, aislamiento, acción farmacológica, preservación, análisis y producción de principios activos y medicamentos. Sin embargo, el trabajo del Farmacéutico no se limita a la manufactura de medicamentos, también es su responsabilidad asegurar la distribución y usos adecuados del producto y determinar que éste cumpla eficientemente con el fin para el cual fue elaborado.

Una de las actividades importantes que realiza el Químico Farmacéutico para garantizar la eficacia del medicamento, es la de aplicar pruebas de estabilidad mediante las cuales se pueda detectar la degradación del principio activo. Además, las pruebas de estabilidad permiten establecer el periodo de tiempo en el que la dosis del principio activo se mantiene dentro de un rango de actividad terapéutica efectiva, así mismo permite predecir la conservación de la presentación y apariencia física del medicamento.

Para determinar la estabilidad de un medicamento, es una condición fundamental contar con un método analítico lo suficientemente específico y sensible para que detecte las variaciones de concentración en los muestreos comúnmente empleados en -

pruebas de estabilidad acelerada, ya que en tales muestreos los porcentajes de activo degradado suelen ser muy bajos, lo cual no obsta para que los productos de degradación puedan interferir - la medición final. Dicho método también debe ser validado con - respecto a exactitud, precisión y linealidad en la presencia de excipientes y productos de degradación. Por ello, un estudio preliminar a las pruebas de estabilidad consiste en decidir sobre el método a utilizar y en fijar una idea sobre la especificidad y cuantitatividad que proporciona.

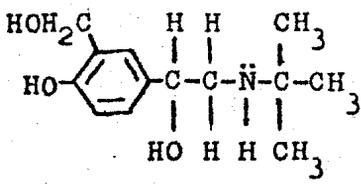
Para seleccionar el método apropiado se debe tener un conocimiento completo de las propiedades físicas y químicas del - activo, los productos de degradación y la cinética de la reac--ción de degradación ( 2 ).

1.- FUNDAMENTACION DEL TEMA.

1.1.- Propiedades de Salbutamol.

El Salbutamol, lo mismo que las catecolaminas, es una molécula que presenta actividad sobre el sistema nervioso, se considera como un fármaco simpatomimético que relaja el músculo liso bronquial por estimulación de  $\beta$ -adrenorreceptores. Se utiliza en el tratamiento de asma, bronquitis y enfisema pulmonar.

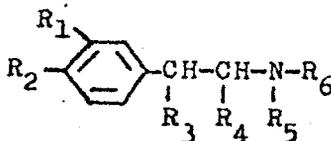
La fórmula desarrollada del Salbutamol es la siguiente:



El Salbutamol presenta un carbono asimétrico en su molécula, por lo que hay la posibilidad de que existan dos isómeros ópticos, (l)-Salbutamol y (d)-Salbutamol. Al comparar la actividad estimulante de los isómeros (l) y (d) y la mezcla racémica sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se encontró que el isómero (l) era aproximadamente equiactivo con el racemato y 80 veces más potente que el isómero (d) ( 3 ).

De la gran cantidad de sustancias cuyas moléculas presentan un esqueleto semejante a la molécula de Salbutamol, se encontró que, cuando se hallan en solución acuosa, tienden a oxi-

arse por efecto de la luz, calor y/o el aire dando soluciones con color que varía del rosa o el café al negro. Además de que los metales, principalmente cobre, fierro y zinc, destruyen notablemente su actividad; las soluciones que contienen un amortiguador de pH ácido (4.2) favorecen su conservación ( 1,4,5,6 ).



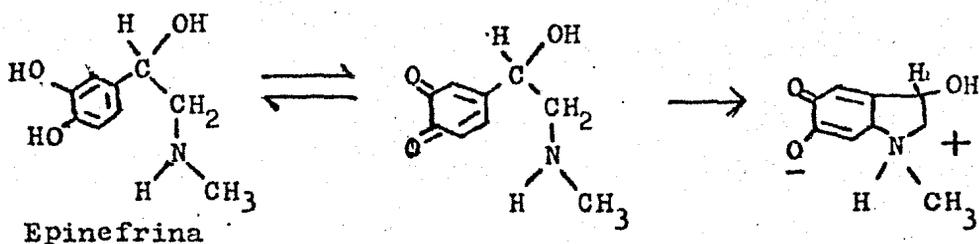
Esqueleto de la molécula de Salbutamol y moléculas estructuralmente relacionadas.

La degradación oxidativa de Salbutamol en solución acuosa sigue una cinética de pseudoprimer orden; la temperatura y el pH tienen un marcado efecto sobre su estabilidad en solución acuosa; la estabilidad es satisfactoria a temperatura ambiente; Salbutamol en solución no se debe formular a pH neutro o básico y tampoco debe ser esterilizada a altas temperaturas ( 7 ).

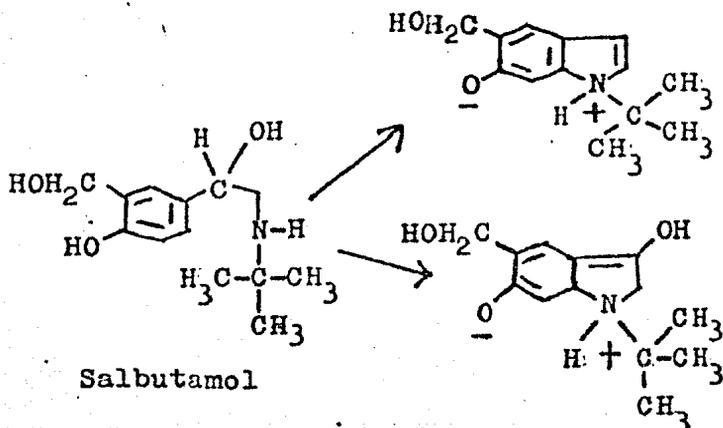
El Salbutamol se puede obtener a partir del éster-5-acil salicílico ( 8 ); es un polvo cristalino blanco que funde a 157-158°C; presenta solubilidad en agua 1:70, en etanol 1:25; es poco soluble en éter y es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Se extrae de las soluciones amoniacaes con acetato de metilo después de saturar con cloruro de sodio ( 4 ).

## 1.2.- Productos De Degradación.

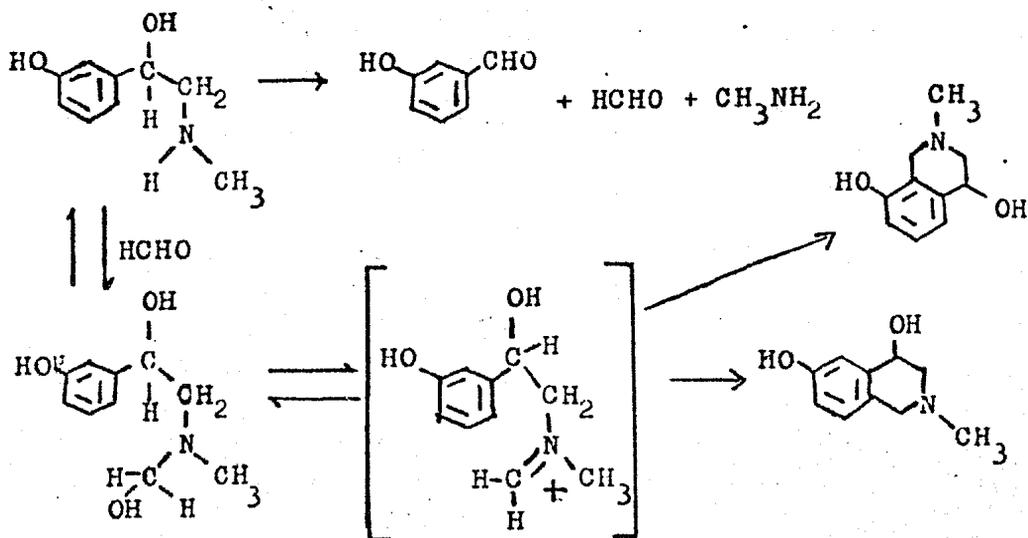
Cuando se desconoce la identidad de los productos de degradación de una sustancia, la vía de degradación puede suponerse sobre la base de grupos lábiles existentes en la molécula, y la indagación de sus productos estará guiada por tales suposiciones ( 9 ). En el Salbutamol, se puede suponer que los grupos fenólico, alcohol primario, alcohol secundario y amino secundario son los grupos lábiles de la molécula. Por otro lado, los productos de degradación resultantes de la oxidación de Salbutamol se pueden proponer, teóricamente, a partir de la observación de las vías de oxidación de compuestos estructuralmente relacionados. Así, la Epinefrina al descomponerse por oxidación forma un compuesto rojo-rosado, llamado Adrenocromo, por la siguiente ruta ( 12 ):



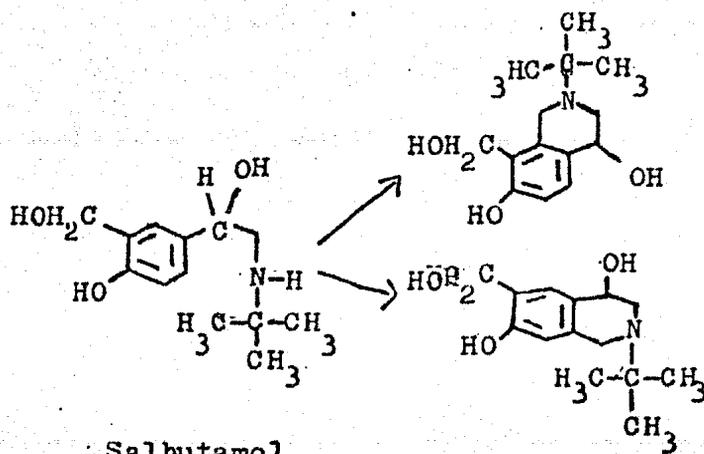
Siguiendo esta vía de degradación para el Salbutamol, se pueden proponer las siguientes estructuras resultantes:



Se ha reportado la identificación de los productos de --  
descomposición de Fenilefrina en solución acuosa por medio de --  
cromatografía en capa fina, cromatografía líquido-gas y espec--  
trometría de masas ( 13 ). La ruta de descomposición propuesta  
para la Fenilefrina es la siguiente:



Seguindo esta ruta para el Salbutamol, las posibles formas estructurales son:



Como los sustituyentes químicos en una molécula modifi--  
 can la velocidad y vía de degradación, a través de efectos pola-  
 res y estéricos ( 11 ), y como los sustituyentes en la molécula  
 de Salbutamol son diferentes a los sustituyentes en las molécul-  
 as de Epinefrina y Fenilefrina, las anteriores suposiciones no  
 dilucidan en forma definitiva la estructura de los productos de  
 degradación de Salbutamol.

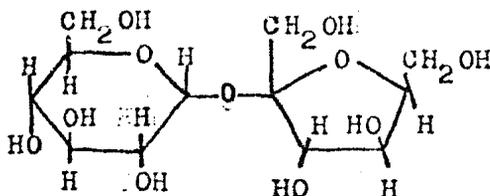
### 1.3.- Excipientes de Salbutamol Jarabe.

Un jarabe es una solución acuosa que contiene una alta -  
 concentración de azúcar, un principio activo y otras sustancias  
 que se usan para aumentar la estabilidad física y química y dar  
 presentación a la forma farmacéutica.

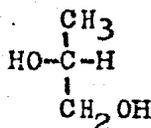
El jarabe de Salbutamol se prepara con Sacarosa, Propi-  
 lenglicol, Sorbitol, color rojo y sabor frambuesa.

Sacarosa: cristales blancos o incoloros, bloques crista-  
 linos o polvo cristalino blanco; inodoro, sabor dulce, estable  
 al aire, soluciones neutras; funde con descomposición entre 160  
 y 185°C; densidad de 1.57; rotación específica de 65.9 a 20°C;  
 no reductor; por fermentación, en soluciones acuosas da alcohol  
 y ácido acético; aún a bajas temperaturas, el ácido sulfúrico -  
 la obscurece y carboniza. Los ácidos minerales diluídos hidroliz-  
 an la Sacarosa para dar una molécula de Dextrosa y una de Levu-  
 losa; como resultado de esta hidrólisis, se produce un cambio -  
 en la rotación óptica, lo que se conoce como inversión del azú-  
 car. Un gramo es soluble en 0.5 ml de agua, 170 ml de alcohol y

en aproximadamente 0.2 ml de agua caliente; insoluble en cloroformo y éter. Se usa para dar viscosidad y consistencia; en altas concentraciones actúa como conservador. ( 1 ).

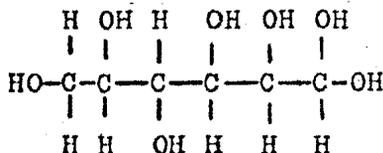


Propilenglicol: es un líquido viscoso, claro, incoloro e inodoro; sabor ligeramente dulce; densidad de 1.035 a 1.037; -- destila entre 184-189°C; absorbe la humedad del aire.



Miscible con agua, alcohol, acetona y cloroformo; soluble en -- éter; inmisible con aceites fijos; se usa como solvente, con--servador y humectante. ( 1 ).

Sorbitol: hojuelas, gránulos o polvo higroscópico blanco; sabor dulce; funde a casi 96°C. Soluble un gramo en aproximadamente 0.45 ml de agua; ligeramente soluble en alcohol, metanol y ácido acético; insoluble en cloroformo y éter.



Tiene una rotación óptica de +13 a +16 en solución alcalina. Se usa como laxante, edulcorante, humectante y vehículo. ( 1 ).

#### 1.4.- Estabilidad de Medicamentos.

El propósito principal de un programa de control de calidad es idear e implementar sistemas y procedimientos que proporcionen una alta probabilidad de que cada producto farmacéutico tenga propiedades que permitan lograr la eficacia y seguridad clínica de la formulación. El diseño de pruebas de estabilidad es una prolongación esencial y pertinente del programa de control de calidad ( 1 ).

La estabilidad de un producto farmacéutico se puede definir como la capacidad de una formulación particular, en un envase determinado, para mantener sus especificaciones químicas, físicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas pretendidas; también puede decirse, que es el período de tiempo que va desde el momento en que se acaba de manufacturar hasta el momento en el que ya no cumple totalmente con las especificaciones - echas en la farmacopea, o hasta el momento en el que la potencia se ha reducido a menos del 90 % ( 14 ).

La asignación de fecha de caducidad es una aplicación directa de los conocimientos adquiridos en los estudios de estabilidad y se define como el tiempo hasta el cual la formulación permanece estable al ser almacenada bajo condiciones recomendadas ( 1 ).

La evaluación de la estabilidad de toda forma farmacéutica, es necesaria para asegurar la identidad, efectividad terapéutica e inocuidad del medicamento hasta el momento de su uso ( 11 ).

Los factores físicos y químicos, como temperatura, radiaciones, concentración de oxígeno, pH y concentración de iones de metales pesados, pueden significar las condiciones suficientes para que las moléculas se presenten en un estado activo y experimenten reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, descarboxilación, racemización o formación de precipitados, que originan cambios químicos que, a su vez, provocan variaciones en las características organolépticas y farmacotécnicas de los productos farmacéuticos, así como la formación de productos indeseables y la disminución de la potencia del principio activo. Otros factores que afectan la estabilidad de los medicamentos, son la interacción potencial entre ingredientes activos e inactivos, el proceso de manufactura, la forma de dosificación, el sistema de sellado del contenedor y las condiciones de embarque y almacenamiento.

#### 1.5.- Métodos de Análisis que Indican Estabilidad.

El análisis químico por grupo funcional, que se basa en la presencia de un grupo químico particular en la estructura de la molécula y que puede realizarse por medio de técnicas instrumentales, está íntimamente relacionado con los métodos de análisis que son apropiados para determinar la estabilidad de los principios activos y sus formas de dosificación ( 2 ).

Aunque los métodos que valoran la concentración de principio activo en la predicción de estabilidad de medicamentos, y los métodos comunes del análisis químico cuantitativo, se funda

entan en el mismo principio de análisis por grupo funcional, - los criterios y detalles experimentales en estudios de estabilidad difieren de los del análisis químico guiado al control de - materia prima o encausado hacia otros propósitos ( 11 ). Para - que un ensayo sea aceptable en ensayos de estabilidad, debe ser suficientemente específico, sensible, lineal, preciso y exacto (lo que se denomina Validación) para diferenciar el fármaco --- inalterado de sus productos de degradación. Además, en lo posible, debe ser rápido, práctico y económico.

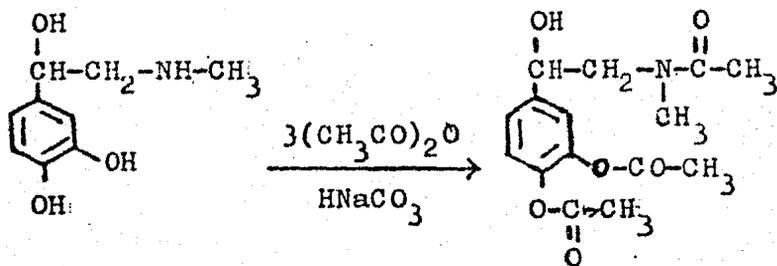
A continuación se citan los fundamentos de algunos métodos de análisis encontrados en la investigación bibliográfica y se hacen algunas consideraciones sobre su aplicabilidad a la determinación de la estabilidad de Salbutamol Jarabe.

A.- Métodos De Extracción Por Medio De Solventes: Basándo se en el comportamiento de las especies ionizadas y no ionizadas, es posible extraer selectivamente a las sustancias ácidas, básicas o neutras por medio de solventes orgánicos. Se puede -- aplicar extracción de una sustancia pura, controlando el pH, la fuerza iónica y el sistema de solventes, o aplicar extracción - de un derivado, controlando la cuantitatividad de la transformación. La pureza del extracto se obtiene midiendo una propiedad específica de la molécula. El método no elimina isómeros u otras sustancias de solubilidad similar ( 2 ).

La aplicación directa de un método de extracción por medio de solventes para el análisis de Salbutamol Jarabe resulta poco práctico debido a que es difícil extraer el catión Salbutamol de sus soluciones acuosas con solventes orgánicos no misci-

les con agua.

Un método de análisis aplicable a soluciones acuosas de epinefrina y Norepinefrina, depende de la conversión cuantitativa de las sustancias en sus derivados 0<sup>3</sup>,0<sup>4</sup>-N-triacetilados, -- que pueden extraerse con cloroformo, pesarse, identificarse y -- examinarse polarimétricamente para determinar la composición es-- terioquímica ( 5, 9, 15 ). La reacción de acetilación para la -- epinefrina es:



Por este procedimiento se obtienen falsos valores altos ya que conduce a una apreciable formación de productos de reacción diferentes a los compuestos triacetilados y favorece la -- acetilación de los productos de oxidación que son parcialmente solubles en cloroformo ( 9 ). Una modificación de este método -- consiste en el aislamiento del producto acetilado por cromato-- grafía de partición con Celita 545, y determinación colorimétri-- ca del adrenocromo formado después de desacetilar, además de es-- pectrofotometría ultravioleta y polarimetría del eluato cloro-- fórmico ( 9, 15 ). Este procedimiento modificado parece dar res-- puesta confiable en el análisis de Adrenalina y Noradrenalina -- en presencia de productos de degradación y es adaptable a otras catecolaminas o sustancias relacionadas ( 9 ). Sin embargo, en.

el desarrollo de métodos similares para compuestos específicos, se debe tener atención especial en las condiciones (solvente, temperatura, catálisis, agente acilante) que permitan una acetilación cuantitativa. En el caso particular de Salbutamol, la velocidad de reacción de esterificación se puede ver afectada por el grupo t-butilo, pues la presencia de grupos voluminosos cerca del lugar de reacción disminuye la rapidez de esterificación ( 16, 17 ).

B.- Métodos Volumétricos: Los métodos por titulación ácido-base, acuosa o no acuosa, en el análisis del principio activo, frecuentemente no ofrecen la especificidad deseada. Sin embargo, pueden utilizarse si los productos de degradación y los demás componentes de la fórmula no interfieren con la titulación. Alternativamente, se puede usar una titulación para detectar la estabilidad del producto, si se emplea un procedimiento adecuado para eliminar las interferencias ( 2 ).

Salbutamol se valora en medio no acuoso usando "solvent blue 19 solution" como indicador. Cada mililitro de ácido perclórico 0.1 N equivale a 0.05767 g de Sulfato de Salbutamol (6).

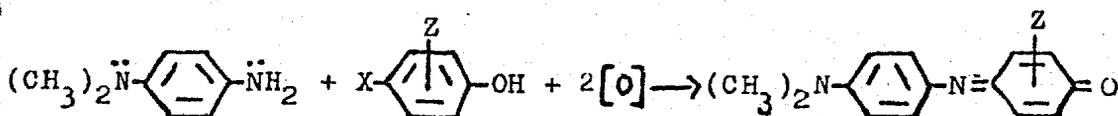
C.- Espectrofotometría Visible y Ultravioleta: Es ampliamente utilizada en análisis farmacéutico, pero generalmente carece de especificidad, pues, por lo común, no hay grandes diferencias entre los espectros de absorción del activo inalterado y los espectros de absorción de los productos de degradación. La especificidad puede obtenerse a través de la separación del compuesto analizado o derivatización de un grupo funcional para transformar el compuesto analizado en otro de respuesta más es-

pecífica.

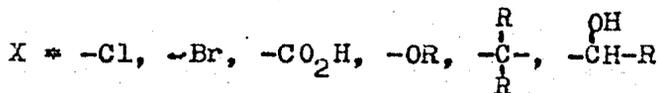
El Salbutamol presenta máxima absorción en el ultravioleta a 276 nm cuando se encuentra en HCl 0.1 N ( 4 ).

Hay un método de cuantificación para Salbutamol en solución acuosa, en el que, por medio de una oxidación de p-aminodimetilanilina y Salbutamol en solución alcalina, se desarrolla un compuesto colorido que presenta máxima absorción a 605 nm en un extracto clorofórmico ( 6, 7 ).

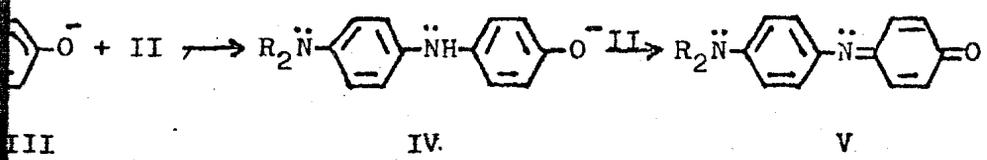
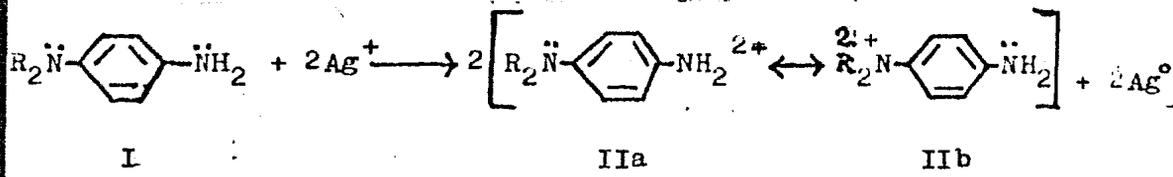
La condensación oxidativa de la p-aminodimetilanilina con una amplia variedad de fenoles p-sustituídos ocurre a través del reemplazamiento del grupo p-sustituyente ( 18, 19, 20 ):



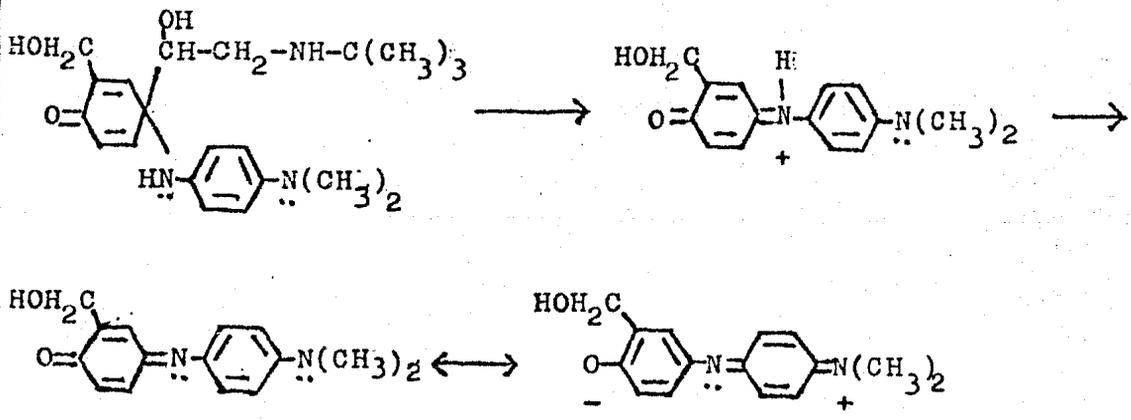
p-aminodimetilanilina



El mecanismo probablemente involucra una oxidación de la diamina (I) a un ión semiquinona (II) que se estabiliza por resonancia (IIa - IIb) y reacciona con el ión fenolato (III) para producir el colorante (IV); un segundo ión semiquinona actúa como aceptor de hidrógeno en el paso final. Entonces el colorante (IV) es oxidado al colorante final (V) por otro ión semiquinona ( 18, 19, 20 ):



Teniendo en cuenta lo anteriormente citado, con respecto a las sustancias coloridas relacionadas con la Indoanilina, la formación del compuesto colorido derivado de Salbutamol podría implicar las siguientes estructuras:



En este tipo de reacción, la formación del producto colorido de una sustancia determinada depende de la presencia del protón ácido del grupo fenol y del tipo de grupo químico que

se halle como p-sustituyente. Hay una lista de fenoles p-susti-  
 tuidos ( 20 ) con los cuales no se observó la formación de colo-  
 rante alguno.

### CUADRO 1

Fenoles p-sustituidos no reactivos ( 20 ).

<u>Grupo</u>	<u>Fenol</u>
R	p-Cresol 3,4-Dimetilfenol p-t-Butilfenol p-Hidroxidifenilo p-Bencilfenol
-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Acido p-Hidroxifenilacético
-CHO	p-Hidroxibenzaldehido
-COR	p-Hidroxipropiofenona p-Hidroxibenzofenona
-CO <sub>2</sub> R	p-Hidroxibenzoato de etilo p-hidroxibenzoato de propilo
-NHCOR	Acetil-p-aminofenol
-N <sub>2</sub> R	p-Hidroxiazobenceno
-OH	Hidroquinona
-AsO <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Acido p-Hidroxifenilarsónico

Aplicando el método de extracción-fotocolorimetría al aná-  
 lisis de muestras de Salbutamol en solución acuosa, se encontró  
 que hay desviación de la Ley de Beer en un rango de 0-3 mg de --  
 Salbutamol ( 7 ).

En un método fotocolorimétrico son muchos los factores --

que pueden originar desviaciones de la ley de Beer; entre tales factores se pueden mencionar ( 21, 44 ):

- a).- Asociación molecular, donde el tipo de moléculas presentes en solución depende de la concentración. Este fenómeno es común en compuestos que contienen grupos hidroxilo; en soluciones muy diluídas sólo hay moléculas monoméricas de alcohol, a medida que la concentración aumenta se van presentando grandes proporciones de moléculas asociadas que originan cambios en la intensidad de absorción;
- b).- pH, sobre todo cuando se emplean reactivos orgánicos con propiedades ácido-base, la absorción del propio reactivo y el estado del ión que se determina en la solución pueden variar como resultado de un cambio en la acidez del sistema;
- c).- Concentración de reactivos, es necesario determinarla para lograr la transformación cuantitativa del compuesto analizado;
- d).- Tiempo de reacción, es indispensable examinar el cambio de absorción del compuesto colorido al dejar en contacto, durante diferentes tiempos, la mezcla de reacción;
- e).- Temperatura, además de poder catalizar la reacción de formación del colorante, puede catalizar la reacción de descomposición; y
- f).- Sustancias extrañas, la sustancia por determinar a menudo está presente con otras sustancias que pueden influir en la absorción de la solución.

Las condiciones para efectuar las reacciones fotométricas se deben estudiar detalladamente a fin de garantizar la reproducibilidad, sensibilidad y seguridad de los resultados. Una vez

Definidas las condiciones óptimas de formación del compuesto colorido, se establece el rango de concentraciones en el que se cumple la relación lineal entre absorbancia y concentración. El principal criterio práctico para evaluar la utilidad de cada reacción fotométrica es el que comprende el análisis estadístico de los resultados ( 21 ).

D.- Fluorometría: La medición de la fluorescencia es una técnica analítica útil aplicada a compuestos que por sí mismos presentan fluorescencia o que pueden dar derivados fluorescentes.

Se reporta un análisis fluorométrico de soluciones acuosas de Salbutamol, en el que se encuentra que la intensidad de la fluorescencia está linealmente relacionada con la concentración en el rango de  $0-6.9 \times 10^{-4}$  M de Salbutamol. ( 7 ). Aparentemente, se pudieron controlar la autoextinción de la fluorescencia que ocurre generalmente en los ensayos fluorométricos y la alteración de la fluorescencia que ocurre por la presencia de productos de degradación interferentes.

E.- Polarimetría: Mide el grado con el cual las sustancias ópticamente activas hacen girar el plano de la luz polarizada. En estudios de estabilidad, la polarimetría puede ser un buen recurso siempre y cuando la sustancia analizada sea la única que presente actividad óptica y cuando la degradación destruya notablemente el centro asimétrico, de lo contrario las diferencias en el poder rotatorio serían muy pequeñas y caerían dentro del error del método ( 11 ).

F.- Detección de los Productos de Degradación: El método que indica la estabilidad del principio activo se puede contro-

lar por medio de un procedimiento que detecte la posible presencia de los productos de degradación. El método de detección debe distinguir eficazmente entre el activo inalterado y los productos de degradación; debe tener gran sensibilidad, puesto que generalmente el porcentaje de producto degradado es muy bajo, en muchos casos inferior al 10 % ( 11 ). La Espectroscopía Infrarroja, la Resonancia Magnética Nuclear y la Polarografía son muy útiles para estos fines cuando el producto de degradación presenta un grupo funcional de señal intensa que no existe en el producto original.

G.- Cromatografía: Cuando no es posible determinar directamente el activo, debido a la presencia de sustancias interferentes, es conveniente que al análisis final le anteceda un procedimiento de separación. La cromatografía es una alternativa muy utilizada para separar mezclas de sustancias que tienen propiedades fisicoquímicas muy similares y cuya separación por otros métodos sería muy difícil o imposible. Se caracteriza porque los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases inmiscibles entre sí. La naturaleza física de las fases y el mecanismo para ponerlas en contacto dan origen a varios tipos de cromatografía: en papel, en capa fina, de intercambio iónico, de gases y de líquidos a alta presión ( 17 ). Los dos últimos tipos mencionados no sólo ofrecen un medio de separación, sino que proporcionan información cuantitativa muy útil ( 2 ).

La cromatografía en capa fina es un método que se puede aplicar a la detección de productos de degradación. En todo caso, hay que tener la certeza de que el sistema de solventes usado se

are realmente al activo de los productos de degradación, y que la reacción de revelado sea lo suficientemente sensible para detectar el activo alterado aún en pequeñas cantidades.

Los siguientes son sistemas de Cromatografía en Capa Fina encontrados para la detección de Salbutamol:

#### Sistema I.

- a) Disolvente de la Muestra.- Agua o Metanol.
- b) Fase Estacionaria.- Gel de Sílice G.
- c) Fase Móvil.- 4 % de Hidróxido de Amonio, 16 % de Agua, 30 % de Alcohol Isopropílico y 50 % de Acetato de Etilo.
- d) Revelador.- Nitroanilina Diazoada en atmósfera de Dietilamina.

#### Sistema II.

- a) Disolvente de la Muestra.- Acido Acético 2 N.
- b) Fase Estacionaria.- Gel de Sílice G.
- c) Fase Móvil.- Una parte de Hidroxido de Amonio y 5 partes de Alcohol Metílico.
- d) Revelador.- Permanganato de Potasio al 1 %.

#### Sistema III.

- a) Disolvente de la Muestra.- Agua.
- b) Fase Estacionaria.- Avicel.
- c) Fase Móvil.- 50 % de Agua, 40 % de Butanol y 10 % de Acido Acético.
- d) Revelador.- Fluoresceína al 2 %.

La cromatografía de intercambio iónico se ha aplicado a - problemas analíticos en los que se tiene que separar sustancias de soluciones acuosas ( 22, 23 ), preparaciones farmacéuticas, - como jarabes, elixires y tabletas ( 24, 25 ), e incluso aislar-- las de muestras biológicas ( 26, 27, 28, 29 ). Se utilizan diver- sos materiales ("resinas") que tienen propiedades iónicas. El in- tercambio iónico es un proceso de intercambio reversible de can- tidades equivalentes de iones de la misma carga entre un líquido y la resina ( 17, 30, 31 ).

La estabilidad de Salbutamol en solución acuosa, se ha es- tudiado ( 32 ) usando un método de separación en el que se combi- nan la técnica de mallaje molecular ( para separar Salbutamol de productos de degradación no básicos por medio de una columna de Sephadex ) con el procedimiento de cromatografía de líquidos a - alta presión ( para separar Salbutamol de los productos básicos por medio de una columna de Spherisorb ); la determinación final se realiza por espectrofotometría ultravioleta a 278 nm.

#### 1.6.- Criterios Estadísticos Para Validación De Métodos Analíticos ( 33, 34, 36 ).

La aplicación de métodos estadísticos al trabajo de labo- ratorio permite determinar, entre otras cosas, la precisión y -- exactitud de los resultados obtenidos, establecer una correla--- ción entre dos variables y comparar la eficiencia de dos métodos analíticos. En pocas palabras, ofrece la ventaja de obtener ma-- yor información sobre los resultados experimentales.

La confiabilidad de los resultados obtenidos con un método analítico se conoce al determinar exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad y linealidad del método.

A.- Exactitud: Se llama exactitud a la concordancia existente entre un valor determinado experimentalmente y su valor real. Para verificar lo anterior, en la práctica se cuantifica el compuesto de interés adicionado en cantidades conocidas a -- placebo de la forma farmacéutica. A la cantidad porcentual determinada se la llama Porcentaje de Recobro. Una forma de evaluar la exactitud en función de los resultados experimentales, es contrastar, por medio de una prueba t de Student, si los valores obtenidos difieren significativamente del valor real considerado como 100 % de recobro.

B.- Precisión: Es una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales respecto a un valor central. Se divide en repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se refiere a la concordancia entre resultados sucesivos obtenidos con el mismo método y bajo las mismas condiciones ( analista, - aparato, tiempo, laboratorio, etc. ). La reproducibilidad es la concordancia entre valores individuales obtenidos con el mismo método, pero bajo diferentes condiciones.

Una de las formas para determinar la repetibilidad, es -- contrastar la hipótesis, a través de una prueba de Ji-cuadrada, de que la ~~variación de los resultados~~ es menor o igual al 1 %. En base a este criterio de aceptación, se establece una hipóte-

sis de contraste tal que la varianza poblacional ( $\sigma^2$ ) sea --- igual a 0.01. La reproducibilidad, ya que representa la variación de resultados debida a diferencias en cuanto a analista, - aparato, etc., se puede evaluar a través de la prueba estadística del análisis de varianza de dos ó más factores, según sea el diseño, probando la significación de cada fuente de variación.

C.- Especificidad: Se refiere al grado en que los resultados del método se deben sólo a la sustancia de interés y no a otras sustancias que estén presentes en la formulación, es decir, indica si los excipientes de la formulación y/o productos de degradación formados interfieren con la señal medida. La especificidad se demuestra al analizar: a) el placebo de la formulación bajo las mismas condiciones en que se analiza el producto farmacéutico; b) la forma farmacéutica sometida a degradación acelerada.

D.- Sensibilidad: Es la menor cantidad del compuesto que se puede detectar con el método de análisis. La sensibilidad raramente es constante sobre un rango grande de concentraciones, y por lo tanto, sólo es significativa si se especifica el rango de concentración.

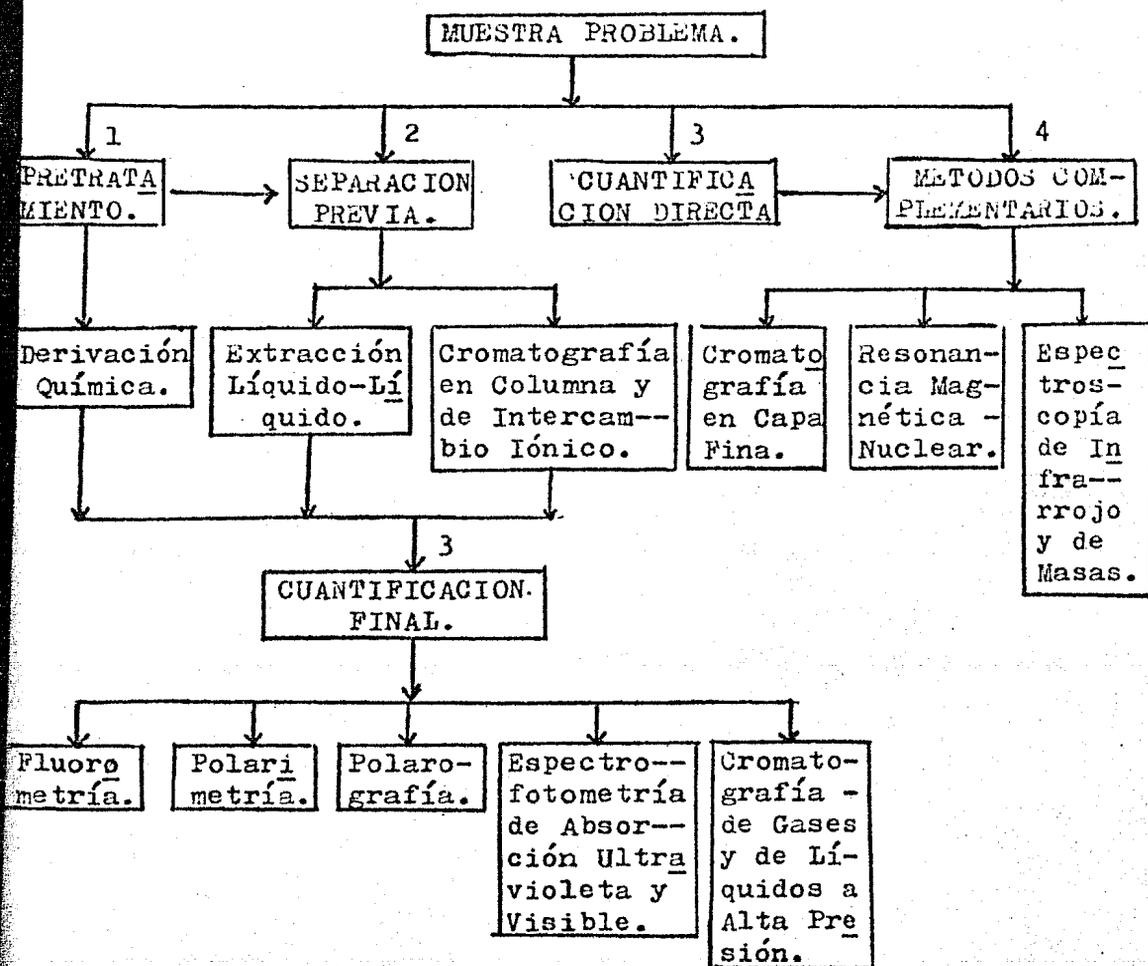
E.- Linealidad: Mide el grado en que la respuesta del método, al trabajar a diferentes concentraciones, se aproxima a una función lineal del tipo  $y=a+bx$ , donde "y" es la variable de pendiente o respuesta medida, "x" es la variable independiente o concentración, "a" es la ordenada al origen e indica el valor de la respuesta medida que corresponde a cero de concentración,

"b" es la pendiente, un valor que representa las variaciones de "y" por cada variación de "x". En la práctica se grafican los datos experimentales, de tal manera que la cantidad recobrada - esté en función de la cantidad adicionada al placebo para observar el grado en que los resultados se comportan como una función lineal. Para conocer los valores numéricos de la función lineal, se aplica el análisis de regresión, y para estimar el porcentaje de la variación de "y" que está asociada con la variación de "x", se aplica el análisis de correlación.

## 2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Para cuantificar cualquier compuesto químico con propiedades farmacológicas que se encuentre en una formulación medicamentosa, y obtener información sobre su estabilidad, se pueden proponer dos alternativas a seguir de acuerdo a las características del método analítico seleccionado y según las propiedades del principio activo, de los excipientes y de los productos de degradación. La primera ruta que se pueda seguir es la cuantificación del activo en presencia de los excipientes y productos de degradación, siempre y cuando estos no interfieran con la variable de respuesta que se mide y que es característica del principio activo. La segunda opción se sigue cuando los excipientes y/o productos de degradación interfieren con el análisis, y consiste en realizar una separación cuantitativa del activo intacto previa a la medición final.

Vías Alternativas Para La Cuantificación Del  
Principio Activo En Un Producto Farmacéutico.



No se ha reportado un método a propósito para cuantificar albutamol, formulado en jarabe, en presencia de sus productos de degradación; en la literatura relacionada con el tema, se describen métodos que se aplican al análisis de: a) compuestos no relacionados con Salbutamol que se encuentran en solución acuosa o en formulaciones complejas; b) compuestos relacionados con Salbutamol que forman parte de una solución acuosa o de una forma farmacéutica; y c) Salbutamol en solución acuosa. De estos últimos, se eligió, para ser estudiado, debido a su factible especificidad y relativa accesibilidad económica y de materiales para el laboratorio farmacéutico, un método que combina la extracción líquido-líquido con la espectrofotometría de absorción en el rango de la luz visible. El problema consiste, pues, en determinar la aplicabilidad de dicho método como indicador de la estabilidad de Sulfato de Salbutamol formulado en jarabe. Así, surge la necesidad de estudiar, primero, las condiciones de reacción más apropiadas para lograr una extracción cuantitativa del compuesto interesado y, segundo, las especificaciones o validación del método para tener idea de la confiabilidad o incertidumbre que ofrece el mismo.

### 3.- OBJETIVOS.

I.- Analizar los efectos de la concentración de reactivos, del pH, del tiempo de reacción y de excipientes y productos de degradación sobre la formación, separación y Absorbancia del --- compuesto colorido derivado de Salbutamol, contenido en jarabe, al aplicar el método de Extracción líquido-líquido-Fotocolorimetría.

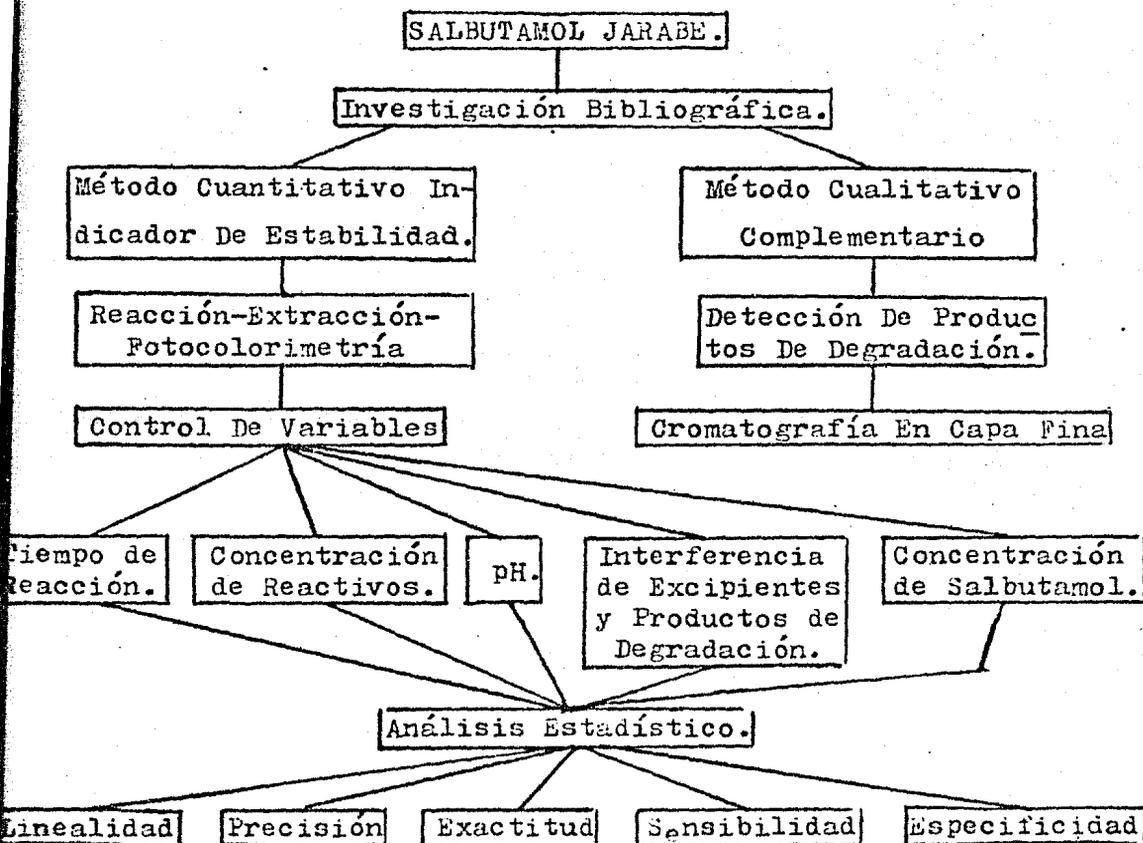
II.- Determinar linealidad, precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad del método de Extracción líquido-líquido-Fotocolorimetría aplicado al análisis de Salbutamol en jarabe.

#### 4.- HIPOTESIS.

La reacción de formación de un compuesto colorido derivado de Salbutamol, por acción de la p-aminodimetilanilina, es específica para este en el medio constituido por los excipientes y productos de degradación, y estudiando las condiciones de reacción y las especificaciones del método de Extracción líquido-líquido-Fotocolorimetría se pueden contemplar la bondad y/o incertidumbre del mismo como indicador de la estabilidad de Salbutamol en jarabe.

## 5.- MATERIAL Y METODO.

Para efectuar el trabajo experimental se requiere del material mencionado a continuación en función del esquema metodológico planteado mediante un diagrama de bloques:



USTANCIAS:

- Sulfato de Salbutamol, materia prima.
- Jarabe de Sulfato de Salbutamol.
- Jarabe Placebo.
- Agua Destilada.
- p-Aminodimetilanilina, reactivo analítico.
- Ferricianuro de Potasio, grado reactivo.
- Bicarbonato de Sodio, grado reactivo.
- Fosfato de Sodio Monobásico, grado reactivo.
- Hidróxido de Sodio, grado reactivo.
- Disolventes Orgánicos ( Cloroformo, Metanol, Hidróxido de Amonio, Alcohol Isopropílico, Acetato de Etilo, Butanol, Acido Acético, Acido Clorhídrico ).
- Permanganato de Potasio, reactivo analítico.
- Fluoresceína, reactivo analítico.

EQUIPO:

- Espectrofotómetro de Doble Haz, "Beckmann".
- Balanza Analítica Monoplato, "Mettler".
- Estufas de Temperatura Constante, "Marsa".
- Refrigerador, "Mabe".
- Potenciómetro, "Beckmann".
- Cronómetro, "Citizen".
- Estufa de Secado, "Caisa".
- Lámpara de Luz Ultravioleta, "Mettler".
- Equipo de Cromatografía en Capa Fina, "Camag".
- Micropipeta de 1000  $\mu$ cl., "Socorex".

MATERIAL DE VIDRIO:

- Matraces Volumétricos, 10, 25, 50, 100, y - 200 ml.
- Pipetas Volumétricas, 1, 2, 4, 5, 10, 25 ml.
- Embudos de Separación, 60 ml.
- Vasos de Precipitados, 50, 250 ml.
- Probetas Graduadas, 50, 100 ml.
- Tubos de Ensaye con Tapón de Bakelita, 50 ml.
- Embudos de Filtración, talle corto.
- Frascos de Boca Ancha, transparentes y de color ambar.
- Ampolletas, 1 ml.
- Varillas de Agitación.

OTROS MATERIALES:

- Soportes Universales.
- Anillos Metálicos.
- Espátulas de Acero Inoxidable.
- Gradilla.
- Pipetas Pasteur.

## 6.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.

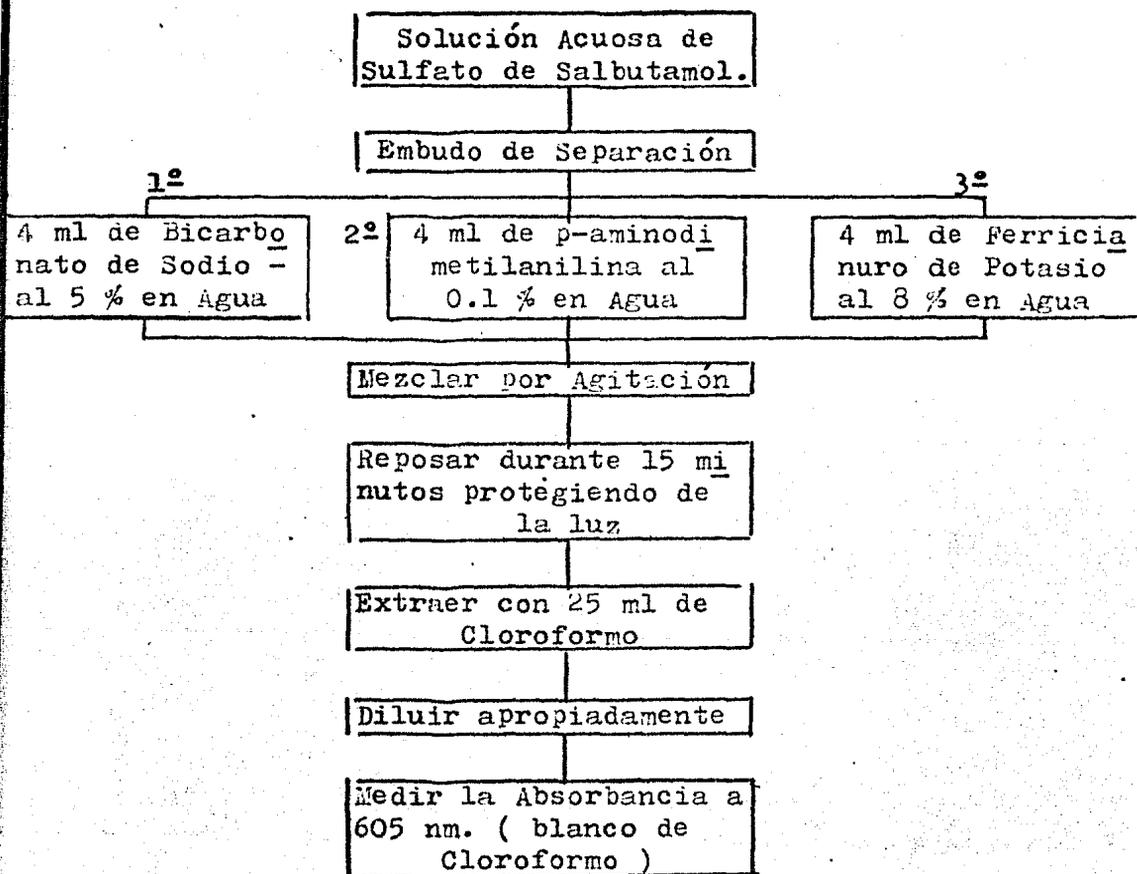
### 6.1.- Estudio de Variables en el Método de Extracción-Fotocolorimetría.

El estudio de las variables implicadas en el método de extracción-fotocolorimetría, se desarrolló en una serie de experimentos que se describen a continuación:

#### EXPERIMENTO # 1

##### Preliminar.

Objetivo.- Observar los detalles del procedimiento aplicado al análisis de Salbutamol en solución acuosa. El procedimiento mencionado es el siguiente:



A menos que se indique otra cosa, se entiende que en cada experimento se siguió este procedimiento. Para preparar soluciones ( estandar, problemas y reactivos ) y en la adición de volúmenes, se usó material volumétrico.

Los resultados del experimento preliminar se anotan en el cuadro número uno:

## CUADRO 1

Absorbancia de muestras estandar de Salbutamol.

Muestra (#)	Salbutamol ( $\mu\text{CG}$ )	Absorbancia (605 nm)	
		Blanco de Reactivos	Blanco de Cloroformo
1	20	0.044	0.054
2	32	0.070	0.078
3	40	0.086	0.096
4	80	0.158	0.162
5	160	0.284	0.280
6	240	0.358	0.356

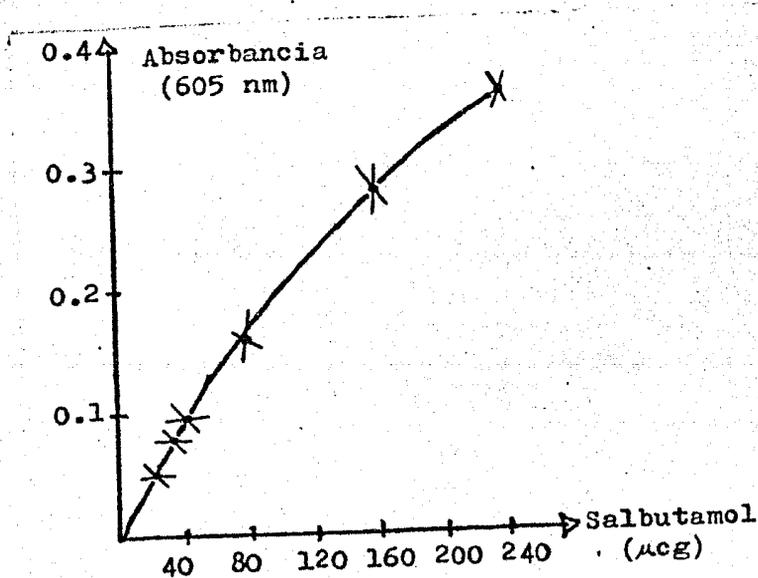
Se presentan las lecturas de absorbancia para c/u de las 6 muestras, obtenidas primero, --- frente a un blanco de cloroformo, y después, frente a un blanco constituido por la mezcla de reactivos en cloroformo.

Observaciones: Hay desviación negativa de la ley de Bouguer-Beer en el rango de 0 - 240  $\mu\text{cg}$ ; la mezcla de reactivos absorbe a 605 nm; para las cantidades de Salbutamol menores a 40  $\mu\text{cg}$ ., se obtienen absorbancias menores de 0.1, y en espectrofotometría de absorción se tiene mayor certidumbre en las lecturas cuando la absorbancia es mayor ó igual a 0.1 y menor ó igual a 0.5; al reaccionar Salbutamol con la mezcla de reactivos, la so-

ucción se torna verde brillante, y al hacer la extracción su color es amarillo-naranja, mientras que la fase cloroformica es de color azul; la ausencia de coloración azul en la última porción de la fase orgánica indica que la extracción del compuesto colorido ha sido completa; para secar la fase orgánica, al separarla de la fase acuosa, se usó un trocito de algodón colocado en el talle de un embudo de filtración.

Gráfica # 1

Absorbancia de muestras estandar de Salbutamol.



Presenta las lecturas del cuadro 1 para Salbutamol frente a un blanco de cloroformo.

## EXPERIMENTO # 2.

Efecto de Tiempo de Reacción.

Objetivo.- Determinar si hay cambios en la absorbancia al variar el tiempo de reposo de la mezcla de reacción.

Se leyó la absorbancia del extracto clorofórmico realizado inmediatamente ( al tiempo "0" ), a los 5, 10, 15, 20, 30, -- 60, 120 y 180 minutos después de haber mezclado los reactivos; - se manejaron muestras de Sulfato de Salbutamol de 100  $\mu\text{cg/ml}$ ; ca da volumen de solución estandar se añadió con micropipeta gradua da de 1000 microlitros; para simplificar el procedimiento, los - embudos de separación se sustituyeron por tubos de ensaye con ta pón de bakelita y capacidad para 50 ml., las fases se separaron con pipeta Pasteur. Además, se examinó la estabilidad de la ab-- sorbancia del compuesto colorido, anotando para cada muestra la primera lectura estable y una lectura más después de estar tres minutos en el espectrofotómetro. Los resultados son los siguien tes:

## CUADRO 2

Efecto del Tiempo de Reacción sobre la Absorbancia.

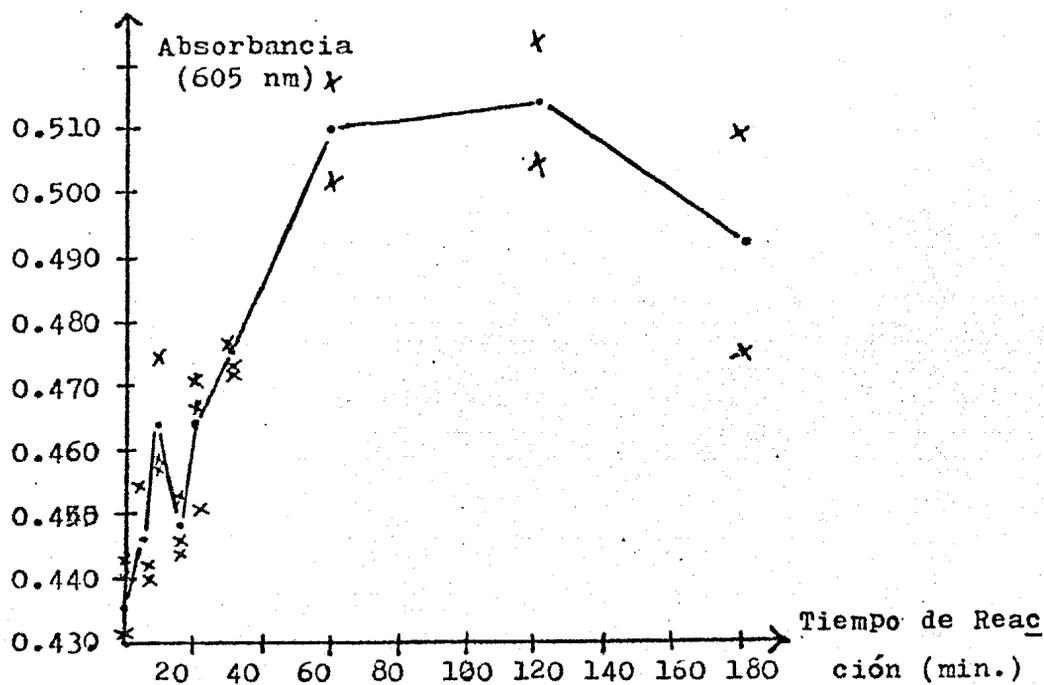
Muestra (#)	Salbutamol ( $\mu\text{G}$ )	Tx (minutos)	Absorbancia (605 nm)	Absorbancia Ty (605 nm)
1	100	0	0.432	0.440
2	100	0	0.440	0.448
3	100	0	0.443	0.441
4	100	5	0.440	0.454
5	100	5	0.442	0.458
6	100	5	0.455	0.465
7	100	10	0.475	0.509
8	100	10	0.458	0.466
9	100	10	0.459	0.467
10	100	15	0.444	0.449
11	100	15	0.446	0.455
12	100	15	0.453	0.462
13	100	20	0.451	0.465
14	100	20	0.468	0.476
15	100	20	0.472	0.480
16	100	30	0.474	0.478
17	100	30	0.477	0.479
18	100	30	0.473	0.476
19	100	60	0.518	0.519
20	100	60	0.502	0.504
21	100	120	0.524	0.527
22	100	120	0.505	0.504
23	100	180	0.475	0.476
24	100	180	0.509	0.512

Tx = tiempo en que se dejó la mezcla de reacción en reposo.

Ty = absorbancia tres minutos después de la primera lectura.

Gráfica # 2

Absorbancia promedio de muestras de igual concentración -  
 contra tiempo de reacción de la mezcla de reactivos.



A pesar de las variaciones de absorbancia para muestras -  
 dejadas a un mismo tiempo de reacción, a partir de la gráfica --  
 # 2, se puede apreciar y suponer que hay un tiempo óptimo de reac-  
 ción por encima y por debajo del cual se obtienen menores valores  
 de absorbancia. La absorbancia promedio mayor corresponde a 120 -  
 minutos para el tiempo de reacción.

## EXPERIMENTO # 3.

Efecto de Excipientes del Jarabe.

Objetivo.- Señalar si los excipientes interfieren o no en el método usado para cuantificar Salbutamol en el Jarabe.

A partir de una solución nodriza de 80 mg de Sulfato de Salbutamol en 200 ml de agua destilada, se prepararon tres muestras estandar de 0.1 mg/ml., y tres muestras de jarabe con 0.1 mg/ml. De cada una de estas seis muestras se tomó un mililitro (equivalente a 100 microgramos), se depositaron en correspondientes matraces de separación, se trataron con los reactivos y se dejaron en reposo durante 120 minutos al abrigo de la luz. Al mismo tiempo, se trataron dos muestras testigo, una constituida por la mezcla de reactivos y la segunda formada por jarabe placebo.

Los resultados se presentan en el cuadro tres, donde se observa, al comparar las respuestas obtenidas para muestras estandar y muestras de jarabe, que las absorbancias de las segundas es mayor que las absorbancias de las primeras a pesar de tener igual concentración de Salbutamol y de que la muestra placebo dió igual respuesta que el testigo de reactivos. Estos resultados se pueden explicar si se considera que las soluciones acuosas de Sulfato de Salbutamol ( 0.1 mg/ml ) tienen un pH de siete y el jarabe tiene un pH de 5.6 y que la absorción de los propios reactivos y el estado del ión que se determina en la solu-

ción, pueden variar como resultado de un cambio en la acidez del sistema, sobre todo cuando se emplean reactivos orgánicos con -- propiedades ácido-base" ( 21 ).

### CUADRO 3

Efecto de la presencia de excipientes sobre la absorbancia de Salbutamol.

Tipo de Muestra	Salbutamol ( $\mu\text{g}$ )	Absorbancia (605 nm)
Estandar 1	100	0.391
Estandar 2	100	0.393
Estandar 3	100	0.392
Jarabe 1	100	0.433
Jarabe 2	100	0.432
Jarabe 3	100	0.435
Placebo	0	0.045
Reactivos	0	0.047

#### EXPERIMENTO # 4

##### Efecto del Amortiguamiento del pH.

Objetivo.- Comprobar si las diferencias de absorción entre muestras estandar y muestras de jarabe se deben a las diferencias de pH.

Se prepararon dos muestras nodriza de Sulfato de Salbuta-

mol de 80 mg en 200 ml de solución amortiguadora de Fosfatos con pH de 6.0, una al 0.1 Molar y la otra al 0.5 Molar. Se prepararon muestras estandar y muestras de jarabe que tenían igual concentración de Salbutamol e igual pH, procediendo de la misma manera que en el experimento # 3.

#### CUADRO 4

Efecto de Amortiguar el pH de las Muestras.

Tipo de muestra	pH	Salbutamol ( $\mu\text{cg}$ )	Molaridad del Amortiguador	Absorbancia (605 nm)
Estandar 1	6	100	0.1	0.394
Estandar 2	6	100	0.1	0.401
Jarabe 1	6	100	0.1	0.415
Jarabe 2	6	100	0.1	0.413
Placebo 1	6	0	0.1	0.042
Reactivos 1	6	0	0.1	0.042
Estandar 3	6	100	0.5	0.398
Estandar 4	6	100	0.5	0.393
Estandar 5	6	100	0.5	0.392
Estandar 6	6	100	0.5	0.392
Jarabe 3	6	100	0.5	0.392
Jarabe 4	6	100	0.5	0.393
Jarabe 5	6	100	0.5	0.380
Jarabe 6	6	100	0.5	0.394
Placebo 2	6	0	0.5	0.057
Reactivos 2	6	0	0.5	0.050

Al igualar el pH de las muestras estandar con el pH de las muestras de jarabe, usando un amortiguador de 0.5 molar, practicamente no se encuentran diferencias en las absorbancias.

## EXPERIMENTO # 5.

Tiempo de Reacción y pH.

Objetivo.- Observar los efectos de las variaciones combinadas de pH y tiempo de reacción.

Se prepararon dos soluciones estandar de Sulfato de Salbutamol con concentración de 0.1 mg/ml., una en un medio acuoso de pH igual a 7, la otra en un medio acuoso de fosfatos al 0.5 Molar que mantienen un pH de 6. Para cada condición de pH se trataron 20 muestras, variando en 15 y 120 minutos el tiempo permitido para el desarrollo del colorante. Para hacer un tratamiento estadístico de los resultados se realizó un análisis de varianza de dos factores.

En el análisis de varianza de dos factores, pH y tiempo de reacción en este caso, se contrastan las siguientes hipótesis:

- 1.-  $H_0$ : En la absorbancia de las muestras, no hay variación debida al sistema de pH.
- 2.-  $H_0$ : En la absorbancia de las muestras, no hay variación debida al tiempo de reacción.
- 3.-  $H_0$ : En la absorbancia de las muestras, no hay variación debida a la interacción entre los dos factores.

Todos los contrastes F del análisis de varianza son unilaterales y tienen por región crítica  $F_{calculada} > F_{1-\alpha}$ .

Con nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 5 %, el valor correspondiente de  $F_{1-\alpha}$  es de 4.08. ( Grados de Libertad:  $f_1 = 1$   $f_2 = 40$  ).

CUADRO 5A

Valores de absorbancia de muestras a dos pH diferentes y dos tiempos de reacción distintos .

Sistema/Tiempo (pH) (min):	15		120	
Amortiguador 0.5 M	0.369	0.369	0.351	0.345
	0.368	0.370	0.350	0.343
	0.376	0.362	0.347	0.345
	0.365	0.365	0.353	0.346
	0.371	0.370	0.349	0.343
	$\bar{x} = 0.3685$		$\bar{x} = 0.3472$	
Acuoso	0.403	0.401	0.394	0.397
	0.402	0.397	0.402	0.397
	0.404	0.395	0.400	0.398
	0.403	0.393	0.395	0.397
	0.397	0.399	0.396	0.395
	$\bar{x} = 0.3994$		$\bar{x} = 0.3971$	

El sistema amortiguador representa un pH de 6 y el sistema acuoso un pH de 7.

## CUADRO 5B

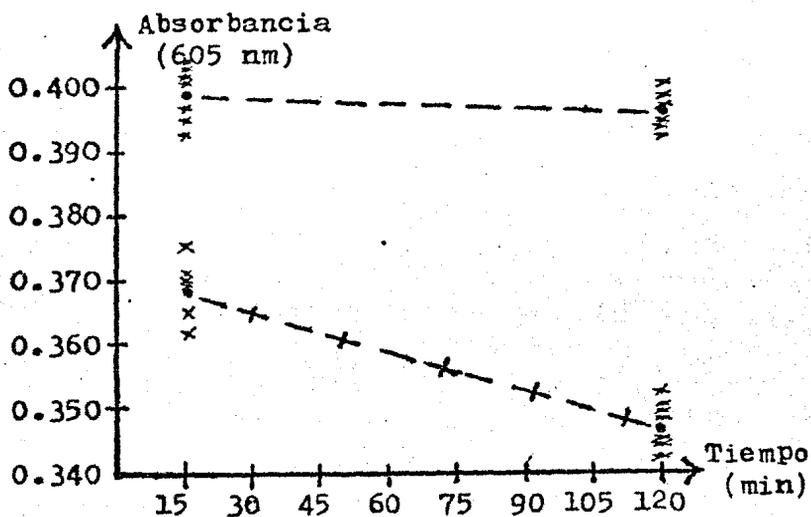
## Análisis de Varianza de dos Factores.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Hipótesis
pH	1	0.6528	0.6528	723.10	Hr: rechazada
Tiempo de Reacción	1	0.0557	0.0557	61.69	Hc: rechazada
Interacción	1	0.0361	0.0361	39.38	Hi: rechazada
Error	36	0.0325	0.0009		
Total	39	0.7771			

Para las tres hipótesis contrastadas  $F$  es mayor que  $F_{1-\alpha}$ . Por lo tanto, con nivel de significancia del 5 % : a) el pH del sistema y el tiempo de reacción si tienen efecto sobre la absorbancia y/o formación del complejo colorido; b) los dos factores si interaccionan entre sí para afectar la absorbancia.

## Gráfica # 3

Efecto del pH y del tiempo de reacción sobre la absorbancia de muestras estándar de Salbutamol.



Línea ( - - - ): Sistema Acuosa, pH = 7

Línea ( - + - + ): Sistema Amortiguador, pH = 6

## EXPERIMENTO # 6

Concentración de Reactivos.

Objetivo.- Determinar el comportamiento de la absorbancia al utilizar los reactivos en diferentes proporciones.

Se preparó un estándar de Sulfato de Salbutamol de 0.1 -- mg/ml en una solución de Fosfatos 0.5 M y pH de 6. Se usaron soluciones de Bicarbonato de Sodio al 5 %, p-aminodimetilanilina - al 0.1 % y Ferricianuro de Potasio al 8 % en agua. El tiempo de reacción fué de 120 minutos.

## CUADRO 6

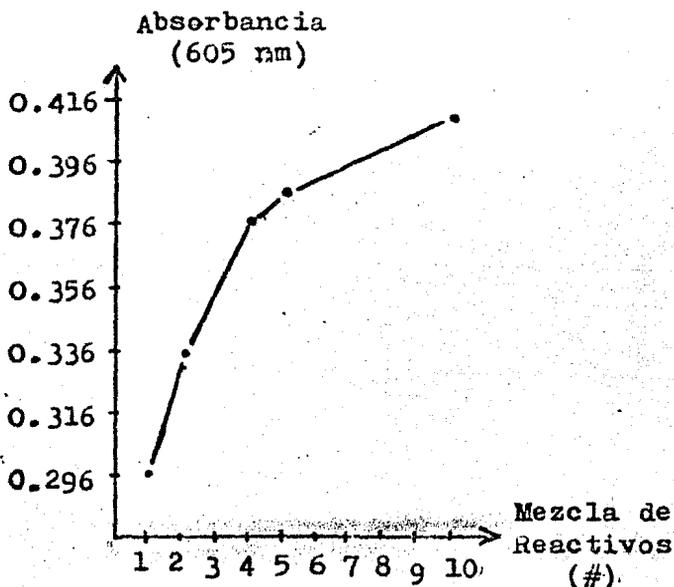
Efecto de la Concentración de Reactivos sobre la Absorbancia.

Muestra (#)	Salbutamol ( $\mu$ cg)	Amina (mg)	Bicarbonato (mg)	Ferricianuro (mg)	Absorbancia (605 nm)
1	100	1	50	80	0.296
2	100	2	100	160	0.335
3	100	4	200	320	0.376
4	100	5	250	400	0.386
5	100	10	500	800	0.409
6	0	1	50	80	0.018
7	0	4	200	320	0.097
8	0	10	500	800	0.165

Las muestras 6, 7 y 8 son muestras testigo en las que sólo hay mezcla de reactivos.

## Gráfica # 4

Comportamiento de la Absorbancia al Variar la Concentración de los Reactivos.



Los puntos graficados corresponden a las absorbancias para las muestras de Salbutamol tratadas con las concentraciones de reactivos correspondientes, indicadas en el cuadro # 6 para las muestras 1, 2, 3, 4 y 5.

Las proporciones de reactivos probadas se seleccionaron de manera que estuvieran por encima y por debajo de las cantida-

les usadas en el experimento preliminar ( 4 mg de Amina, 200 mg de Bicarbonato y 320 mg de Ferricianuro ). En el cuadro 6 se encuentra que la absorbancia aumenta al incrementarse la concentración de los reactivos con los que se tratan tanto muestras estándar como muestras testigo. Sin embargo, al hacer las correcciones de absorbancia de las muestras 1, 3 y 5 con los valores de absorbancia de las muestras testigo 6, 7 y 8, se obtienen resultados muy cercanos entre sí ( 0.278, 0.279 y 0.244 respectivamente ).

Con los resultados obtenidos en este experimento, se puede pensar que cualquier concentración de reactivos en exceso es adecuada para formar cuantitativamente la sustancia colorida derivada de Salbutamol, ya que la absorbancia debida al exceso de reactivos se puede corregir con el tratamiento de una muestra testigo constituida por la mezcla de reactivos. No obstante, lo ideal en un método analítico es que la respuesta final medida sea debida sólo al compuesto de interés.

#### EXPERIMENTO # 7

##### Concentración de Salbutamol.

Objetivo.- Establecer una región de concentraciones de Salbutamol donde se cumpla una relación lineal entre absorbancia y concentración.

Se utilizaron muestras estándar de Salbutamol con 80, 85,

0, 95 y 100  $\mu\text{cg}/\text{ml}$  en medio de fosfatos al 0.5 Molar y pH de 6, de igual manera se prepararon muestras de jarabe con las mismas concentraciones y pH mencionados. De cada concentración, tanto de jarabe como de estandar, se hicieron 8 determinaciones añadiendo en cada caso 1 ml de p-aminodimetilanilina al 0.1 %, 1 ml de bicarbonato de sodio al 5 % y 1 ml de ferricianuro de potasio al 8 %; el tiempo de reacción permitido para el desarrollo del compuesto colorido fué de 120 minutos.

Se eligió el rango de 80 a 100  $\mu\text{cg}$  de Salbutamol porque son cantidades que se pueden manejar fácilmente a partir de la concentración original en el jarabe ( 0.4 mg/ml ) y porque en el control de la estabilidad se recomienda la detección del 10 % de degradación ( 11 ); el rango escogido representaría un margen de 0 a 20 % de degradación en muestras de jarabe que tuvieran 100  $\mu\text{cg}$  de Salbutamol como 100 % de activo.

CUADRO 7A

Absorbancia para Muestras Estandar de Salbutamol.

Salbutamol Estandar ( $\mu\text{cg}$ )	80	85	90	95	100
Absorbancia (605 nm)	0.262	0.276	0.298	0.310	0.330
	0.262	0.276	0.299	0.310	0.331
	0.264	0.278	0.300	0.312	0.332
	0.264	0.280	0.302	0.316	0.332
	0.268	0.283	0.302	0.316	0.332
	0.272	0.283	0.304	0.316	0.333
	0.276	0.284	0.306	0.320	0.334
	0.280	0.285	0.308	0.328	0.335

CUADRO 7B

Absorbancia para Muestras de Jarabe.

Salbutamol Jarabe ( $\mu\text{cg}$ )	80	85	90	95	100
Absorbancia (605 nm)	0.266	0.275	0.295	0.308	0.329
	0.266	0.278	0.300	0.312	0.330
	0.268	0.278	0.300	0.314	0.332
	0.269	0.280	0.301	0.314	0.332
	0.269	0.282	0.302	0.316	0.334
	0.271	0.282	0.302	0.316	0.335
	0.273	0.288	0.306	0.318	0.335
	0.274	0.290	0.307	0.325	0.339

Con los datos de los cuadros 7A y 7B, se determinaron los valores promedio de absorbancia para cada cantidad de Salbutamol en muestras estandar y muestras de jarabe. Con estos valores promedio, que aparecen en el cuadro 7C, se trazaron las dos líneas de la gráfica # 5 y se determinaron, por mínimos cuadrados, la ecuación de la recta de mejor ajuste ( $y = a + bx$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ). Además, a partir de la gráfica estandar, gráfica # 6, y de los valores promedio de absorbancia para las muestras de jarabe, se determinaron los porcentajes de Salbutamol recuperado de las muestras de jarabe. Estos porcentajes se anotan en el cuadro 7D.

CUADRO 7C

Valores Promedio de Absorbancia para -  
cada Cantidad de Salbutamol en Muestras Estandar y Muestras de Jarabe.

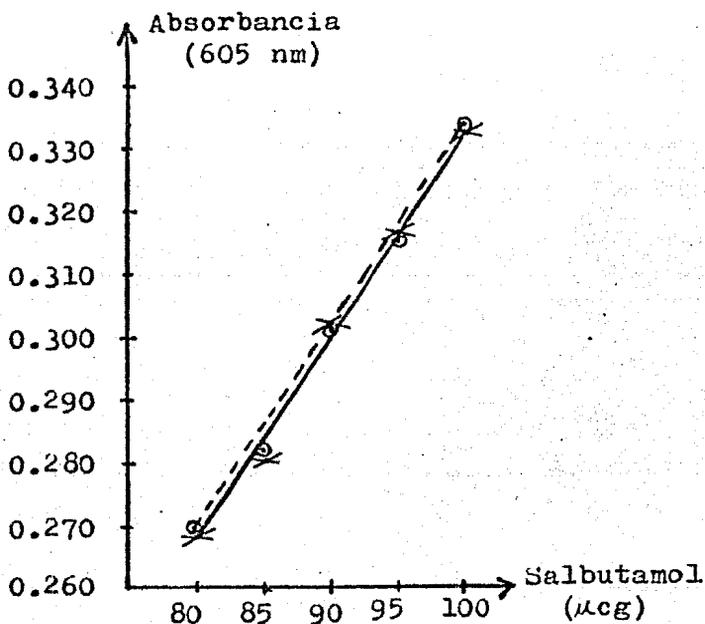
Salbutamol ( $\mu\text{cg}$ )	Absorbancia Promedio	
	Muestras Estandar	Muestras de Jarabe
80	0.2685	0.2695
85	0.2806	0.2816
90	0.3024	0.3016
95	0.3160	0.3154
100	0.3324	0.3333

Para las muestras estandar:  $Y=0.0062+0.0033X$  ;  $r=0.9969$

Para las muestras de jarabe:  $Y=0.0098+0.0032X$  ;  $r=0.9977$

Gráfica # 5

Absorbancia Promedio contra Cantidad de Salbutamol en Muestras Estandar y Muestras de Jarabe.

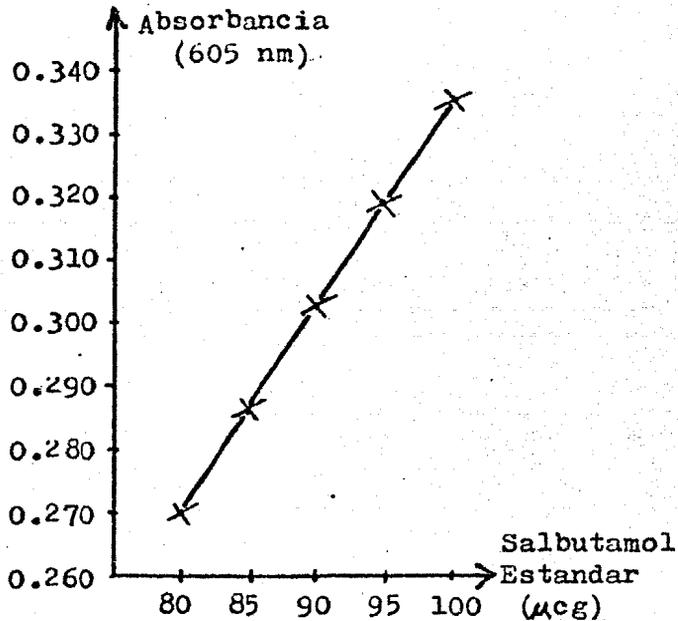


Línea (x ——— x): Muestras Estandar.

Línea (o - - - -o): Muestras de Jarabe.

## Gráfica # 6

Curva Estandar: Línea de Mejor Ajuste por Mínimos Cuadrados.



Los puntos graficados, determinados por la ecuación de la línea de mejor ajuste, son: - 80, 0.2702; 85, 0.2867; 90, 0.3032; 95, 0.3197 y 100, 0.3362

## CUADRO 7D

Porcentaje Promedio de Salbutamol Recuperado.

Salbutamol añadido ( $\mu\text{cg}$ )	80.00	85.00	90.00	95.00	100.00
Salbutamol recuperado ( $\mu\text{cg}$ )	80.66	84.36	90.74	94.90	99.93
% de recu- peración	100.83	99.25	100.82	99.89	99.93

## EXPERIMENTO # 8

Efecto de Productos de Degradación.

Objetivo.- Observar si los productos de degradación influyen o no en la determinación cuantitativa de Salbutamol.

Se sometieron muestras de jarabe de Sulfato de Salbutamol a varias temperaturas ( ambiente, 4, 30, 45 y 60°C. ). Después de 240 días, se suspendió el tratamiento de temperatura, se hicieron las diluciones pertinentes para tener una solución de cada muestra con una concentración teórica de Salbutamol de 0.1 mg/ml. Se analizó por tetraplicado 1 ml de cada muestra bajo las mismas condiciones de reactivos y pH que en el experimento # 7.

## CUADRO 8A

Absorbancia de Muestras de Jarabe de Salbutamol  
Mantenidas a Diferentes Temperaturas.

Temperatura (°C)	4	ambiente	30	45	60
Absorbancia (605 nm)	0.322	0.315	0.292	0.236	0.115
	0.326	0.318	0.292	0.230	0.110
	0.327	0.318	0.292	0.237	0.112
	0.325	0.317	0.290	0.235	0.110

Las muestras fueron tratadas durante el mismo tiempo, 240 días, a la temperatura correspondiente. Cada una de las veinte muestras analizadas, tenía una cantidad inicial teórica de 0.1 mg de Salbutamol.

A partir del cuadro anterior, se obtuvo el valor promedio de las lecturas de absorbancia a cada temperatura; por medio de la ecuación de la línea recta de mejor ajuste para la curva estandar, se determinó la cantidad de Salbutamol no degradado en cada tratamiento de temperatura.

## CUADRO 8B

Cantidad de Salbutamol Degradado en Muestras de Jarabe a diferentes Temperaturas.

Temperatura (°C)	Absorbancia Promedio (605 nm)	Salbutamol Intacto (μg)	Salbutamol Degradado (%)
4	0.325	96.60	3.40
ambiente	0.317	94.18	5.82
30	0.292	86.60	13.40
45	0.234	69.03	30.97
60	0.112	32.06	67.94

## EXPERIMENTO # 9

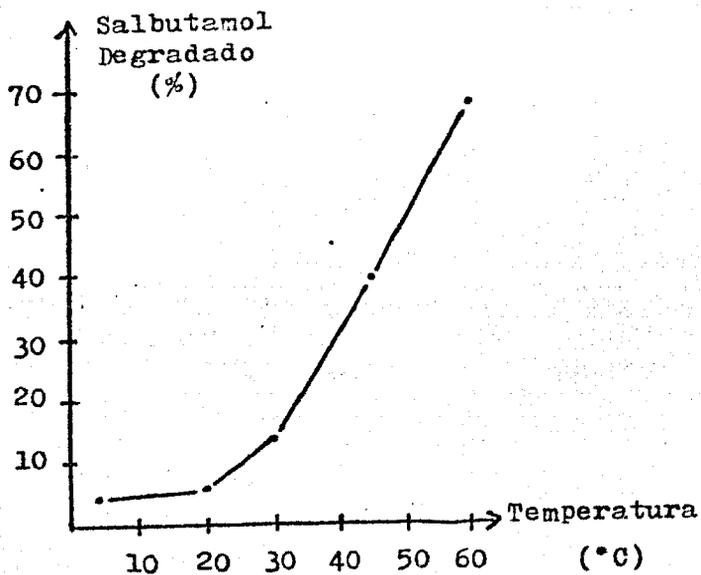
Detección de Productos de Degradación.

Objetivo.- Determinar si las absorbancias del cuadro 8A corresponden solamente a la formación de compuesto colorido a partir de moléculas de Salbutamol y no a la formación de sustancias coloridas a partir de los productos de degradación.

Se realizó cromatografía en capa fina de la muestra sometida a degradación acelerada a 60°C., para separar el principio activo intacto y los productos de degradación y tratar ambas ---

## Gráfica # 7

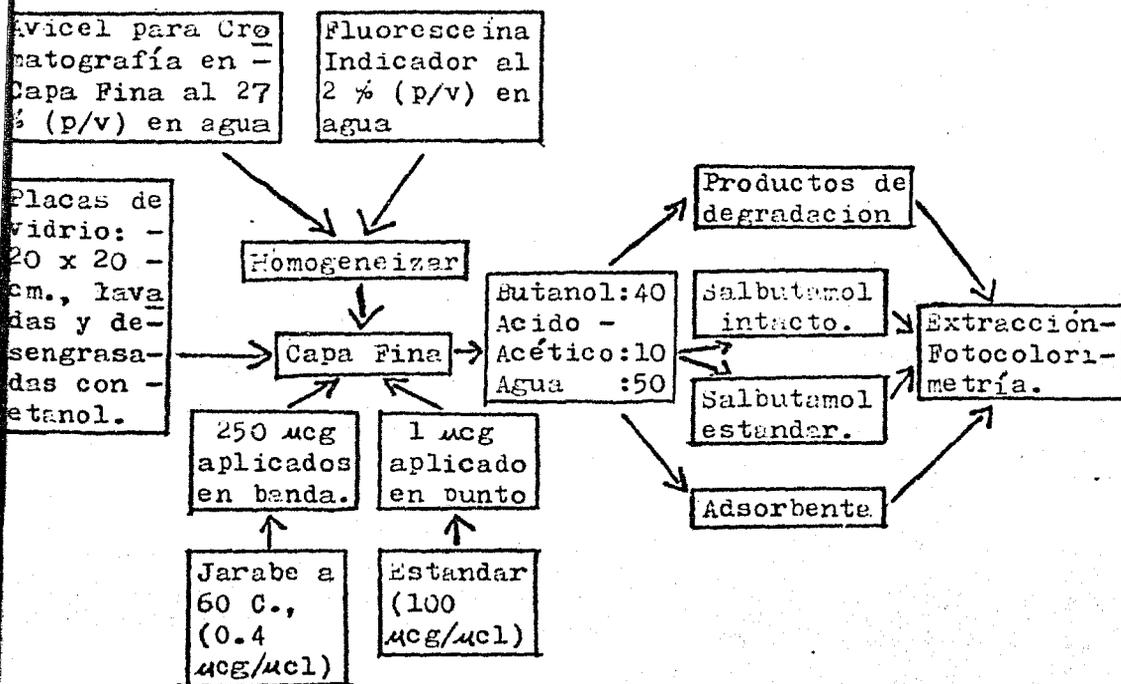
Porcentaje de Salbutamol Degradado  
en función de la Temperatura.



Trazada con datos del cuadro 8B.

fracciones y un estandar por medio del método estudiado y comparar las absorbancias. Se aplicó el sistema cromatográfico número tres citado en la fundamentación del tema. El siguiente diagrama ilustra el procedimiento planeado:

Cromatografía en Capa Fina como Control del Método de Extracción-Fotocolorimetría para Salbutamol Jarabe.



No se concluyó el experimento porque, debido al gran volumen (625 µcl) de jarabe aplicado a la capa fina, a la semicaramelización del azúcar al calentar la muestra, y a la alta densidad del jarabe, se tuvieron problemas de adsorción y de elución de la muestra de jarabe aplicada a la capa fina del adsorbente. Para resolver este problema, se podría diluir la muestra

de jarabe, pero a medida que se aumenta la dilución, aumenta el volumen que es necesario aplicar para tener un equivalente a 100 mcg. Por esto, se optó por detectar, separar y analizar los productos de degradación provenientes de muestras estandar de 100 mcg/mcl contenidas en ampolletas cerradas para evitar el posible cambio de concentración que podría ocurrir por evaporación del disolvente al calentar. Con las muestras así preparadas, se aplicaron los sistemas cromatográficos II y III, pero no se pudieron detectar los productos de degradación.

## 6.2.- Validación del Método de Extracción-Fotocolorimetría.

### A.- Linealidad.

Se calcularon los parámetros indicadores de relación lineal entre absorbancia y concentración a partir de los datos de porcentaje de recobro calculados, utilizando los datos de los cuadros 7A y 7B, por medio de la relación:

$$\% \text{ de Recobro} = \frac{A_j}{A_s} \times 100$$

$A_j$  = Absorbancia de la muestra de jarabe.

$A_s$  = Absorbancia de la muestra estandar.

## CUADRO 9

Porcentaje de Recobro en Muestras de Jarabe.

Salbutamol adicionado ( $\mu\text{g}$ )	Salbutamol recuperado ( $\mu\text{g}$ )	Porcentaje de recobro (%)
80	81.2214	101.53
80	81.2214	101.53
80	81.2121	101.52
80	81.5152	101.89
80	80.2985	100.37
80	79.7059	99.63
80	79.1304	98.91
80	78.2857	97.86
85	84.6920	99.64
85	85.6159	100.72
85	85.0000	100.00
85	85.0000	100.00
85	84.6996	99.65
85	84.6996	99.65
85	86.1972	101.41
85	86.4912	101.75
90	89.0910	98.99
90	90.2970	100.33
90	90.0000	100.00
90	89.7030	99.67
90	90.0000	100.00
90	89.4079	99.34
90	90.0000	100.00
90	89.7120	99.68
95	94.3871	99.35
95	95.6129	100.65
95	95.6090	100.64
95	94.3987	99.37
95	95.0000	100.00
95	95.0000	100.00
95	94,4063	99.38
95	94.1311	99.09

## Continuación del Cuadro 9

Salbutamol adicionado ( $\mu\text{cg}$ )	Salbutamol recuperado ( $\mu\text{cg}$ )	Porcentaje de recobro (%)
100	99.6970	99.70
100	99.6970	99.70
100	100.0000	100.00
100	100.0000	100.00
100	100.6024	100.60
100	100.6006	100.60
100	100.2994	100.30
100	101.1940	101.19

El Salbutamol recuperado, variable dependiente representa  
 a como "Y", está en función de la cantidad adicionada, variable  
 independiente representada como "X".

$$\Sigma x = 3600$$

$$\Sigma y = 3603.8325$$

$$\Sigma xy = 326320.6710$$

$$\Sigma x^2 = 326000$$

$$\Sigma y^2 = 326662.7016$$

n = 40 observaciones

$$\bar{x} = 90$$

$$\bar{y} = 90.0958$$

Grados de Libertad

$$n - 2$$

$$S_x = 7.1611$$

$$S_y = 7.1118$$

1.- Ordenada al origen:  $A = 1.1872$

2.- Pendiente:  $B = 0.9879$

3.- Ecuación de la Recta de Mejor Ajuste:  $\hat{Y} = 1.1872 + 0.9879X$  ;  
para los valores fijos de Salbutamol adicionado (X), se estiman los valores de Salbutamol recuperado ( $\hat{Y}$ ):

X	$\hat{Y}$
80	80.2171
85	85.1564
90	90.0958
95	95.0352
100	99.9745

4.- Error Típico de Estimación:  $S_{xy} = 0.5487$

Error Típico de Estimación Modificado:

$$0.5629 = \hat{S}_{xy} = S_{xy} \sqrt{\frac{n}{n-2}}$$

5.- Sensitividad:

$$f = \frac{B_i}{\hat{S}_{xy}} = 1.7550$$

6.- Error Experimental:  $E_{j(i)} = \sum (y_i - \hat{y}) = 0.0006$

7.- Coeficiente de Correlación:  $r = 0.9947$

8.- Coeficiente de Determinación:  $r^2 = 0.9895$  ;  $1 - r^2 = 0.0105$  ;  
el 1.05 % de la variación de la absorbancia no está asociada con la variación de la concentración de Salbutamol.

.- Inferencias sobre la Ordenada al Origen (A):

a) Hipótesis Contrastada.-  $H_0: A = A_0$  ; donde  $A_0 = 0$  y la hipótesis alternativa es  $H_1: A \neq 0$

b) Estadígrafo de Contraste.-

$$T_{A_0} = \frac{A - A_0}{\hat{S}_{xy} \sqrt{\frac{\sum(x^2)}{n \sum(x_i - x)^2}}}$$

Nivel de Significancia.-  $\alpha = 0.05$

c) Región Crítica Bilateral.-

$$T_{A_0} \leq T_{\alpha/2} (n-2) \text{ y } T_{A_0} \geq T_{1-\alpha/2} (n-2)$$

$$T_{A_0} = 1.0448 \quad ; \quad T_{\alpha/2} = -2.0301 \quad ; \quad T_{1-\alpha/2} = 2.0301$$

Como  $T_{A_0}$  no se localiza en la región crítica, se acepta la hipótesis contrastada.

d) Intervalo de Confianza del 95 % para A.-

$$a - T_{\alpha/2} \cdot \hat{S}_{xy} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum(x_i - x)^2}} < A < a + T_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{xy} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum(x_i - x)^2}}$$

$$1.1872 - 2.0301 (1.1363) < A < 1.1872 + 2.0301 (1.1363)$$

$$1.1872 \pm 2.0301 (1.1363)$$

$$\text{Límite inferior al } 95 \% = -1.1196$$

$$\text{Límite superior al } 95 \% = +3.4990$$

$$c (-1.1196 \leq A \leq 3.4940) = 95 \%$$

0.-Inferencias sobre la Pendiente (B):

a) Hipótesis Contrastada.-  $H_0: B = B_0$  ; donde  $B_0 = 1$  y la hipótesis alternativa es  $H_1: B \neq B_0$

b) Estadígrafo de Contraste.-

$$T_{B_0} = \frac{(B - B_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{xy}}$$

Nivel de Significancia.-  $\alpha = 0.05$

c) Región Crítica Bilateral.-

$$T_{B_0} \leq T_{\alpha/2} (n-2) \text{ y } T_{B_0} \geq T_{1-\alpha/2} (n-2)$$

$$T_{B_0} = -0.9613 \quad ; \quad T_{\alpha/2} = -2.0301 \quad ; \quad T_{1-\alpha/2} = 2.0301$$

Como  $T_{B_0}$  no cae dentro de la región crítica, a un nivel de significancia del 5 %, se acepta la hipótesis contrastada.

d) Intervalo de Confianza del 95 % para B.-

$$b - T_{\alpha/2} \cdot \frac{\hat{S}_{xy}}{s_x \sqrt{n-1}} < B < b + T_{1-\alpha/2} \cdot \frac{\hat{S}_{xy}}{s_x \sqrt{n-1}}$$

$$0.9879 - 2.0301 (0.0126) < B < 0.9879 + 2.0301 (0.0126)$$

$$0.9879 \pm 2.0301 (0.0126)$$

$$\text{Límite inferior al 95 \%} = 0.9623$$

$$\text{Límite superior al 95 \%} = 1.0135$$

$$c (0.9623 \leq B \leq 1.0135) = 95 \%$$

### 3.- Exactitud.

Los cálculos se realizaron a partir de los datos de porcentaje de recobro del cuadro 9:

$$\bar{x} = 100.1110$$

$$n = 40$$

Grados  
de Libertad

$$s = 0.8709$$

$$s/\sqrt{n} = 0.1377$$

$$n - 1$$

a) Hipótesis Contrastada.-  $H_0: \mu = \mu_0$  ; donde  $\mu_0 = 100 \%$   
y la hipótesis alternativa es  $H_1: \mu \neq \mu_0$

b) Estadígrafo de Contraste.- 
$$T = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

Nivel de significancia.- 0.05

c) Región Crítica Bilateral.-  $T \leq T_{\alpha/2}$  y  $T \geq T_{1-\alpha/2}$

$$T = 0.08061 \quad T_{\alpha/2} = -2.0301 \quad T_{1-\alpha/2} = 2.0301$$

Como  $T > T_{\alpha/2}$  y  $T < T_{1-\alpha/2}$ , a un nivel de significancia del 5 %, se acepta la hipótesis contrastada.

d) Intervalo de Confianza del 95 % para  $\mu$ .-

$$\bar{x} \pm T_{1-\alpha/2} (s/\sqrt{n})$$

$$100.111 \pm 2.0301 (0.1377)$$

$$\text{Límite inferior} = 99.8315$$

$$\text{Límite superior} = 100.3905$$

$$c (99.8315 \leq \mu \leq 100.3905) = 95 \%$$

### C.- Precisión (Repetibilidad).

Contraste de hipótesis para la varianza del porcentaje de

recobro:

$$s = 0.8709$$

$$s^2 = 0.7585$$

$$(n-1) s^2 = 29.5815$$

$$n = 40$$

$$\text{grados de libertad} = n-1$$

a) Hipótesis Contrastada.-  $H_0: \sigma^2 \leq \sigma_0^2$  ; donde  $\sigma_0^2 = 0.01$  y la hipótesis alternativa es  $H_1: \sigma^2 > \sigma_0^2$

b) Estadígrafo de Contraste.-  $\chi^2 = \frac{(n-1) s^2}{\sigma_0^2}$

Nivel de Significancia.-  $\alpha = 0.05$

c) Región Crítica Unilateral Superior.-  $\chi^2 \geq \chi_{1-\alpha}^2$

$$\chi^2 = 2958.15$$

$$\chi_{1-\alpha}^2 = 55.758$$

Como el valor de  $\chi^2$  es mayor que el valor de  $\chi_{1-\alpha}^2$ , se rechaza la hipótesis contrastada. Por lo tanto, a un nivel de significancia del 5 %, la variación del porcentaje de recobro es mayor al 1 %.

d) Intervalo de Confianza del 95 % para  $\sigma^2$ .-

$$\frac{(n-1) s^2}{\chi_{1-\alpha/2}^2} \leq \sigma^2 \leq \frac{(n-1) s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}$$

$$\chi_{1-\alpha/2}^2 = 59.342$$

$$\chi_{\alpha/2}^2 = 24.433$$

Límite inferior = 0.4984

Límite superior = 1.2118

$$c (0.4984 \leq \sigma^2 \leq 1.2118) = 95 \%$$

D.- Especificidad.

Al examinar los cuadros 7A y 7B, se encuentra que los valores de absorbancia para las muestras estandar de Salbutamol -- con concentraciones establecidas, son aproximadamente iguales a los valores de absorbancia para las muestras de jarabe de Salbutamol con concentraciones correspondientes. Es decir, los excipientes no afectan apreciablemente las respuestas de absorbancia debidas a la presencia de Salbutamol en las muestras de jarabe.

Definitivamente, no se puede concluir que el método es específico para Salbutamol con respecto a los productos de degradación, debido a que estos no se pudieron aislar por medio de la cromatografía en capa fina.

E.- Sensibilidad.

En el experimento # 7 se analizaron muestras estandar que tenían entre sí diferencias de 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{cg}$  de Salbutamol; a continuación se presentan los resultados del análisis, con el mismo procedimiento y condiciones que se manejaron en el experimento # 7, de muestras que tenían entre sí diferencias de 1, 2 y 3  $\mu\text{cg}$ .

## CUADRO 10

Absorbancia de Muestras Estándar de Salbutamol.

Salbutamol ( $\mu\text{cg}$ )	96	97	98	99
Absorbancia (605 nm)	0.334	0.324	0.338	0.312
	0.336	0.324	0.345	0.336
	0.348	0.326	0.346	0.348
Absorbancia Estimada	0.323	0.326	0.329	0.332

La absorbancia estimada es la que se determina por medio de la ecuación de la línea de mejor ajuste  $y = 0.0062 + 0.0033x$ , determinada en el experimento 7. Para 95 y 100  $\mu\text{cg}$ ., las absorbancias respectivas son 0.319 y 0.336 .

Al observar los resultados de absorbancia y compararlos con los valores de absorbancia estimados con la regresión lineal, no se encuentra una concordancia entre el aumento de la cantidad de Salbutamol y la absorbancia; esto se puede deber a que el método no es lo suficientemente sensible para discernir cantidades de Salbutamol que difieran en 1, 2 ó 3  $\mu\text{cg}$ ., o puede ser causa de la escasa repetibilidad de una lectura de absorbancia para una cantidad de Salbutamol dada. También es posible que al hacer un mayor número de observaciones en cada caso y al determinar el valor promedio, se tenga una aproximación hacia las absorbancias de la estimación lineal.

## 7.- RESULTADOS.

Experimento N° 1 : Con el método estudiado, se analizaron muestras estandar de 20 a 240 microgramos de sulfato de salbutamol en solución acuosa; se encontró, de acuerdo a la gráfica # 1, que hay una desviación de la ley de Beer (la ley de Beer indica que la representación gráfica de la absorbancia en función de la concentración es una línea recta). Sin embargo, un análisis de regresión y correlación de los datos de absorbancia del cuadro 1 obtenidos frente a un blanco de cloroformo, arrojan los siguientes valores de ordenada al origen (a), pendiente (b), coeficiente de correlación (r) y coeficiente de correlación ( $r^2$ ) que indican que si hay una correlación lineal entre ambas variables implicadas:

$$a = 0.0389 \quad b = 0.0014 \quad r = 0.9935 \quad r^2 = 0.9871$$

En este experimento, también hay que hacer notar que la mezcla de reactivos muestra absorbancia a 605 nm.

Experimento N° 2 : Se examinó el efecto que tenía la variación del tiempo de reacción permitido entre salbutamol y los reactivos. Las muestras que tuvieron un tiempo de reacción de 120 minutos, presentaron una absorbancia promedio mayor que las muestras con menor tiempo de reacción y mayor que la absorbancia promedio de las muestras dejadas a 180 minutos.

Experimento N° 3 : Al comparar las absorbancias de muestras de jarabe y muestras estandar, que tenían iguales cantida-

es de salbutamol, se observó que las absorbancias de las muestras de jarabe eran mayores y se planteó la hipótesis de que era debido sólo a la diferencia de pH entre ambos tipos de muestras.

Experimento N° 4 : Al amortiguar el pH de muestras estandar y muestras de jarabe, a un valor de 6 con una solución de fosfatos al 0.5 Molar, se eliminaron las diferencias de absorbancia.

Experimento N° 5 : Por medio de un análisis de la variación de dos factores, a un nivel de significancia del 5 %, se determinó que hay variación principal de la absorbancia de muestras estandar de salbutamol, debida a cambios en el pH del sistema y/o cambios en el tiempo de reacción.

Experimento N° 6 : Ya se había previsto, en el experimento # 1, que la mezcla de reactivos en solución clorofórmica absorbía a 605 nm., aquí se confirma que al aumentar la proporción de los reactivos, aumenta la absorbancia leída para una misma concentración de salbutamol. La absorbancia debida al exceso de reactivos, se puede corregir con el uso de un blanco de reactivos.

Experimento N° 7 : Con muestras de 80, 85, 90 95 y 100 microgramos de salbutamol y utilizando valores promedio de absorbancia (8 muestras) para cada nivel de concentración, se estableció linealidad del método en dicho rango tanto para estandar como para jarabe.

Experimento N° 8 : El análisis de muestras de jarabe de sulfato de salbutamol sometidas a degradación acelerada, revela que a una mayor temperatura se tiene un mayor porcentaje de salbutamol degradado. Sin embargo, los resultados no indican si los productos de degradación influyen o no en la determinación cuantitativa de salbutamol.

Experimento N° 9 : Para determinar la influencia de los productos de degradación y como control del método estudiado, se recurrió a la cromatografía en capa fina para detectar los productos de degradación; no se obtuvo éxito con los sistemas cromatográficos utilizados.

Especificidad: Como consecuencia de los resultados del experimento N° 9 , no se pudo corroborar la especificidad del método para salbutamol con respecto a los productos de degradación.

Sensibilidad: Al analizar muestras estandar que tenían 96, 97, 98 y 99 microgramos de salbutamol, se obtuvieron valores promedio (3 muestras por nivel de concentración) de 0.3393, 0.3247, 0.3430 y 0.3320 respectivamente, lo que se puede interpretar como falta de sensibilidad del método para diferenciar entre degradaciones de 1 y 2 microgramos de salbutamol.

#### Análisis Estadístico.

A partir de los datos de porcentaje de recobro se determinaron linealidad, exactitud y precisión.

Linealidad.- Análisis de Regresión y Correlación:

$$y = 1.1872 + 0.9879x$$

$$S_{xy} = 0.5487$$

$$r^2 = 0.9895$$

El 98.95 % de la variación del porcentaje de recobro está asociado con la variación de la cantidad de salbutamol añadida.

Exactitud.- Contraste de Hipótesis a través de una Prueba t de Student: Se contrastó la hipótesis de -- que la cantidad de salbutamol recuperada es igual al 100 %. Con un nivel de significancia del 5 %, se aceptó la hipótesis contrastada.

Precisión.- Contraste de Hipótesis a través de una Prueba ji-cuadrada: Se contrastó la hipótesis de que la varianza del porcentaje de recobro era igual o menor al 1 %. Con un nivel de significancia del 5 %, se rechazó la hipótesis contrastada.

## 8.- CONCLUSIONES.

a.- La absorbancia del compuesto derivado de Salbutamol en solución clorofórmica, cambia notablemente al modificarse el tiempo de reacción, por lo que es importante establecer tiempos de reacción bien definidos.

b.- La formación del compuesto colorido depende del pH de la solución en la que se encuentra el Salbutamol. De modo que se hace necesario manejar muestras estandar y problema que tengan igual pH. Con este fin. se debe adicionar un sistema amortiguador inerte en el medio de reacción.

c.- La mezcla de reactivos en solución no es muy estable y presenta absorbancia a 605 nm., por lo que hay que determinar el exceso de reactivos, mínimo y necesario, para desarrollar el compuesto colorido.

d.- De acuerdo al análisis de regresión y correlación, el método estudiado es lineal en el intervalo de 80 a 100  $\mu$ cg.

e.- Conforme al contraste de hipótesis y con un nivel de significancia estadístico del 5 %, el método es exacto pero carece de precisión.

f.- En cuanto a la especificidad, se puede decir que, a excepción del pH, ninguno de los excipientes del jarabe interfiere

re con la respuesta medida para Salbutamol. Sin embargo, no se estableció si había o no especificidad del método con respecto a los productos de degradación.

g.- Al usar el método estudiado como indicador de la estabilidad de Salbutamol en jarabes, se debe considerar que:

- i) Debido a la falta de repetibilidad, para trazar la curva estándar se hacen varias determinaciones de absorbancia a cada cantidad de Salbutamol manejada.
- ii) Se estableció linealidad en el rango limitado de 80 a 100  $\mu\text{cg}$ .
- iii) El método no es lo suficientemente sensible como para diferenciar las degradaciones de uno y dos  $\mu\text{cg}$ .
- iv) El método detecta la degradación debida a cambios en la constitución química, pero no indica si hay alteración de la actividad farmacológica por posibles cambios en la configuración espacial (racemización).

## 9.- PROPUESTAS.

Cualquiera que sea el método que se pretenda aplicar como indicador de la estabilidad, es conveniente separar y detectar los productos de degradación para determinar si hay interferencia de estos con la respuesta medida. Por lo tanto, para profundizar en el estudio de los productos de degradación, se propone re-examinar los sistemas de cromatografía en capa fina usados, investigar otros sistemas de cromatografía en capa fina o considerar las posibilidades de aplicar una técnica que proporcione información sobre la estructura molecular de los compuestos, para hablar acerca de si los productos de degradación de salbutamol desarrollan, frente a los reactivos del método, algún compuesto que absorba a 605 nm.

Por otro lado, se propone utilizar la cromatografía de intercambio iónico, para separar salbutamol de los excipientes del jarabe, como método preparativo que anteceda a una determinación cuantitativa del principio activo por medio de otros métodos de análisis; por ejemplo, la polarimetría, en la que de antemano se puede predecir interferencia de los excipientes, que resultaría útil para evaluar si el salbutamol en el jarabe experimenta fenómenos de racemización que alteren su actividad farmacológica.

## 10.- ANEXO,

Se incluyen notas y fórmulas de cálculo sobre regresión, correlación y análisis de varianza.

1.- Regresión y Correlación.

El análisis de regresión consiste en medir el grado de dependencia lineal de una variable dependiente (y) sobre una variable independiente (x); se puede emplear para predecir el valor de (y) que resultará de la aplicación de un valor específico de (x).

El principio de mínimos cuadrados dice que una línea de regresión se ubica de tal manera que hace mínima la suma de cuadrados de desviaciones verticales de los valores (y) observados con respecto al valor ( $\tilde{y}$ ) estimado sobre la recta de mejor ajuste. Las fórmulas de cálculo para la ecuación de la recta de mejor ajuste son las siguientes:

$$\hat{y} = a + b(x - \bar{x}) ; \text{ donde}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$a = \bar{y} = \frac{\sum y_i}{n}$$

$$b = \frac{L_{xy}}{L_{xx}}$$

$$L_{xy} = n \sum x_i y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i) \quad L_{xx} = n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2$$

El valor de  $S_{xy}$  se suele llamar error típico de estimación ya que es una medida del grado de desviación de los valores (y) estimados por la recta con respecto de los observados efectivamente. Se calcula de la siguiente manera:

$$S_{xy}^2 = \frac{L_{xx} \cdot L_{yy} - L_{xy}^2}{n(n-2) \cdot L_{xx}} ; \text{ donde}$$

$$L_{yy} = \sum n y_i^2 - (\sum y_i)^2$$

$$S_{xy} = \sqrt{S_{xy}^2}$$

Dos variables están correlacionadas cuando la variación de una está asociada con la variación de la otra. La correlación se expresa mediante un coeficiente (r) que puede tomar valores desde -1 hasta +1. Un coeficiente de 1, positivo o negativo, indica una correlación perfecta entre dos variables. Un coeficiente de cero sugiere una falta completa de correlación. Elevando al

cuadrado el coeficiente de correlación, se obtiene el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), que se emplea como estimación de la intensidad de la asociación entre las dos variables. El coeficiente de determinación estima el porcentaje de la variación de (y) que está asociada con (ó "es explicado por") la variación de (x) ó viceversa.

$$r = \frac{(n\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{[(n\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2] \cdot [(n\sum y_i^2) - (\sum y_i)^2]}}$$

#### B.- Análisis de la Varianza.

El análisis de varianza es una técnica comúnmente empleada para analizar experimentos en que intervienen varios factores, y es aplicable en muchas situaciones experimentales diferentes - de variados grados de complejidad. El objetivo principal del análisis de la varianza es determinar la influencia de cada factor individualmente y en combinación sobre cierta variable de respuesta.

## Análisis de Varianza de Dos Factores.

## Cálculo de F

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F
PH	$r - 1$	$L_R = r \sum R_i^2 - T^2$	$M_R = \frac{L_R}{r - 1}$	$\frac{M_R}{M_W}$
Tiempo de acción	$c - 1$	$L_C = c \sum C_j^2 - T^2$	$M_C = \frac{L_C}{c - 1}$	$\frac{M_C}{M_W}$
Interacción	$(r - 1)(c - 1)$	$L_I = rc \sum t_{ij}^2 - r \sum R_i^2 - c \sum C_j^2 + T^2$	$M_I = \frac{L_I}{(r-1)(c-1)}$	$\frac{M_I}{M_W}$
Error Experimental	$rc(m - 1)$	$L_W = n \sum \sum x_{ijk}^2 - rc \sum \sum t_{ij}^2$	$M_W = \frac{L_W}{rc(m - 1)}$	
Total	$n - 1$	$L_T = n \sum \sum x_{ijk}^2 - T^2$		

### Notación para el Análisis de la Varianza:

- $i$  = índice de fila (nivel del primer factor).
- $j$  = índice de columna (nivel del segundo factor).
- $k$  = índice de la observación individual de una casilla.
- $r$  = número de filas (número de niveles del primer factor).
- $c$  = número de columnas ( número de niveles del 2º factor).
- $m$  = número de observaciones por casilla.
- $x_{ijk}$  = k-ésima observación en la i-ésima fila y j-ésima columna.
- $\bar{x}_{ij}$  = media de las observaciones en la casilla (i,j), es decir, en la fila i y columna j .
- $\bar{x}_{i..}$  = media de las observaciones en la i-ésima fila.
- $\bar{x}_{.j}$  = media de las observaciones en la j-ésima columna.
- $\bar{x}$  = media de todas las observaciones.
- $t_{ij}$  = la suma total de todas las observaciones en la casilla --- (i, j).
- $R_i$  = suma de todas las observaciones de la fila i .
- $C_j$  = suma de todas las observaciones de la columna j .
- $T$  = suma de todas las observaciones.
- $n = rcm$  = número total de las observaciones.

## 11.- BIBLIOGRAFIA.

- ( 1 ) ANDERSON et al., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16th ed., 1980.
- ( 2 ) MOLLICA J.A., AHUJA S. & COHEN J. J.Pharm.Sci., 67, (4); -  
Abril 1978: 443-465. Stability of Pharmaceuticals.
- ( 3 ) HARTLEY & MIDDLEMISS J.Med.Chem., 14, 895. 1975. Absolute Configuration of Optical Isomeres Salbutamol.
- ( 4 ) CLARKE E.G.C. Isolation and Identifacction of Drugs, The Pharmaceutical Press, Vol. 2. London 1975; 1095.
- ( 5 ) The United States Pharmacopeia, 19th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975.
- ( 6 ) Brithish Pharmacopoeia, 1973: 662-663.
- ( 7 ) WALL B.P. & SUNDERLAND V.P., Aust.J. Hosp. Pharm., 6, (4) 1976: 156-160. A Preliminary Study on The Stability of Salbutamol in Aqueous Solution.

- 8 ) COLLIN et al., J.Med.Chem., 13, 1970: 674. Activity-Structure Studies of Salbutamol.
- 9 ) HIGUCHI T. BROCHMANN E., Pharmaceutical Analysis, Interscience, 1961: 491-493, 450-451.
- 10 ) BRITTAIN et al., Nature 219, 862 (1968). Pharmacological Studies of Salbutamol.
- 11 ) SBARBATI N.E., Estabilidad de Medicamentos, El Ateneo Argentina 1975.
- 12 ) CONNORS K.A., AMIDON G.L. & KENNON LL., Chemical Stability of Pharmaceuticals. Wiley Interscience, 1979.
- 13 ) MILLAR B.J., PRIAULX D.J. & SHOTTON E., J.Pharm.Pharmac. 25 Suppl. 24p-31p (1973). Stability of Aqueous Solution of Phenylephrine at Elevated Temperatures: Identification of Decomposition Products.
- 14 ) WHITTET T.D., Am.J.Hosp.Pharm., 21, 438-453 (1964). Factors Affecting Drug Stability.
- 15 ) WELSH LL.H., J.Am.Pharm.Assoc., 44, (8); 507-514 (1955). The Analysis of Solution of Epinephrine and Norepinephrine.

- ( 16 ) MORRISON & BOYD, Organic Chemistry, 2th ed., Allyn and Bacon.
- ( 17 ) CONNORS A.K., A Textbook of Pharmaceutical Analysis, - Jhon Wiley & Sons, New York. 1967.
- ( 18 ) VITUM P.W. & BROWN G.H., J.Am.Chem.Soc., 68, 2235 --- (1946). Indoaniline Dyes I. Some Phenol Blue Derivatives With Substituents in the Phenol Ring.
- ( 19 ) IDEM., Ibidem., 69, 152 (1947). Indoaniline Dyes II. The Effect of Multiple Substitution on the Absorption Phenol Blue.
- ( 20 ) IDEM.; Ibidem., 71, 2287 (1949). Indoaniline Dyes III Coupling of p-substituted Phenols With Oxidized p-aminodimethylaniline.
- ( 21 ) ALEXEIEV V.N., Análisis Cuantitativo, Ed. MIR. Moscú 1976: 469-495.
- ( 22 ) BLAKE M.I., MAKRIS K. & HUNT J., J.Pharm.Sci., 60, 1694 (1971).
- ( 23 ) KRONBERG G.H. & TAKMAN B.H., J.Pharm.Sci., 62, 5 (1973) Degradation of Bronchodilator Agents in Oxymix - System.

- 24 ) CANTWELL F.F., DOMJAN M. & HISKEY C.F., J.Pharm.Sci., -  
63, 4 (1974). Specific Analysis for Homatropine Me  
thylbromide in Syrups.
- 25 ) KELLY C.A. & AURBACH M.E., J.Pharm.Sci., 50, 6 (1961).  
Ion Exchange Separation and Colorimetric Determina  
tion of Phenylephrine in Pharmaceutical Products.
- 26 ) BERGSTROM S. & HANSSON G., Acta Physiol.Scand., 28, 87  
(1951).The Use of Amberlite IRC-50 for Purifica---  
tion of Adrenaline and Histamine.
- 27 ) LUBSCHEZ R., J.Biol.Chem., 183, 731 (1950). Chemical De-  
termination of Histamine in Human Blood.
- 28 ) WHITERHORN J.C., J.Biol.Chem., 13, 674 (1970). Permutit  
As Reagent for Amines.
- 29 ) EULER U.S. & HELLNER S., Acta Physiol.Scand., 22, 161 ---  
(1951). Excretion of Adrenaline and Noradrenaline  
in Urine.
- 30 ) MERCK Servicio Informativo de Reactivos. Intercambiado--  
res Iónicos. 16, México.
- 31 ) SAMUELSON O., Ion Exchanger in Analytical Chemistry. --  
Jhon Wiley & Sons. New York 1953.

- ( 32 ) HAKES L.B. CORBY T.C. & MEAKIN B.J., J.Pharm.Pharmacol. 31, 25p Suppl. (1979). The Stability of Salbutamol Solution.
- ( 33 ) BAUER E.L., Manual de Estadística Para Químicos. Alhambra 2a ed. España. 1974.
- ( 34 ) MASSART D.L., DIJSTRA A. & KANFMAN L., Evaluation and - Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures. Elsevier Scientific Publishing Co., - New York, 1978.
- ( 35 ) REMINGTON R.O. & SCHORR A.M., Estadística Biométrica - y Sanitaria. Prentice Hall International 1974.
- ( 36 ) GARCIA PEREZ M.A., Estudio Comparativo De Dos Métodos - Analíticos Para La Determinación Cuantitativa De - Hidrocortisona En Una Formulación De Hidrocortisona 1 % + Vioformo 3 % En Crema. Tesis. UNAM ENEP - Zaragoza. México. 1983.
- ( 37 ) The Merck Index, Merck and Co., 7th ed., New Jersey. 1960.
- ( 38 ) The United States Pharmacopeia, 20th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1982.

- ( 39 ) VALADES M.M. & OLIVERA G.H., Rev.Mex.Ciencias Farm., 1,  
4 (1969). Estabilidad de Medicamentos.
- ( 40 ) TATTERSFIELD A.E. & McNICOL M.W., The New England Jour-  
nal of Medicine, 24, 281 (1969). Salbutamol and -  
Isoproterenol.
- ( 41 ) MARTIN et al., Eur.J.Pharmacol., 14, 183 (1971). Metabo-  
lic Studies of Salbutamol.
- ( 42 ) MILLARD B.J., PRIAULX D.J. & SHOTTON E., J.Pharm.Pharmac.  
23, 369-373 (1971). Decomposition of Methoxamine  
in Aqueous Solution: Identification of Decomposi-  
tion Products.
- ( 43 ) DIXON W.J. & MASSEY Jr. F.J., Introducción Al Análisis  
Estadístico. McGraw Hill. Madrid 1965.
- ( 44 ) LOTHIAN G.F., Absorption Spectrophotometry, 2<sup>a</sup>ed. Hil-  
ger & Watts London. 1958.
- ( 45 ) SCHEFLER W.C., Bioestadística, Fondo Educativo Interame-  
ricano. 1981.