

870127

31

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA 2ey

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
POR C.L.A.R. PARA LA DETERMINACION DE MALEATO
DE CARBINOXAMINA EN PROCESO Y PRODUCTO
TERMINADO EN CAPSULAS DE LIBERACION CONTROLADA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JUAN SANTOYO MORENO

ASESOR: Q.F.B. BEATRIZ GARCIA V.
GUADALAJARA, JAL., 1989



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. |
|--|------|
| 1.- INTRODUCCION | 1 |
| 2.- GENERALIDADES | 3 |
| A.- Monografía | 3 |
| B.- Antihistamínicos | 10 |
| C.- Validación de Métodos Analíticos | 34 |
| D.- Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia | 58 |
| E.- Sistemas Administradores de droga en forma de liberación controlada para formas sólidas orales | 94 |
| 3.- PARTE EXPERIMENTAL | 118 |
| A.- Determinación de Maleato de Carbinoxamina en Producto Terminado | 118 |
| B.- Determinación de Maleato de Carbinoxamina en Proceso | 118 |
| 4.- RESULTADOS | 129 |
| A.- Producto Terminado | 130 |
| A.1. Linealidad del Sistema | 130 |
| A.2. Precisión del Sistema | 134 |
| A.3. Linealidad del Método | 138 |
| A.4. Porcentaje Recuperado | 140 |
| A.5. Exactitud al 100% | 143 |
| A.6. Precisión (Reproducibilidad) | 146 |
| A.7. Estabilidad de la Muestra | 152 |
| A.8. Especificidad | 156 |
| B.- Proceso | 163 |
| B.1. Linealidad del Sistema | 164 |

| | |
|---|-----|
| B.2. Precisión del Sistema | 168 |
| B.3. Linealidad del Método | 171 |
| B.4. Porcentaje Recuperado | 174 |
| B.5. Exactitud al 100% | 177 |
| B.6. Precisión (Reproducibilidad) | 180 |
| B.7. Estabilidad de la Muestra | 187 |
| B.8. Especificidad | 191 |
| 5.- CONCLUSIONES | 195 |
| 6.- BIBLIOGRAFIA | 197 |

1.- INTRODUCCION.

Los fabricantes de medicamentos han tratado por -- muchos años de asegurar que los productos que preparan -- tengan la calidad deseada de una manera reproducible.

Actualmente en la Industria Farmacéutica el análisis de agentes terapéuticos demanda de mejores técnicas - analíticas, así como de una adecuada instrumentación.

En el laboratorio analítico se están extendiendo - enormemente las técnicas cromatográficas modernas.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (C.L. A. R.) recientemente se ha convertido en una de las técnicas analíticas más extensamente usadas en la Industria Farmacéutica.

A la fecha los conceptos de Control Total de Calidad y de Validación son, sin lugar a dudas, herramientas - que nos permiten conocer mejor nuestros productos y los - factores que afectan su calidad, de tal manera que cuando se aplican adecuadamente, nos llevan a lograr lo que ha - sido objetivo primordial de todo fabricante de medicamen- tos, y que es asegurar que cada unidad de dosificación - elaborada cumpla con las características de calidad dise- ñadas. Dicho de otra manera, estos conceptos nos permiti- - ten "construir la calidad" en lugar de tratar de contro- - larla".

Los sistemas administradores de droga en la forma - de liberación controlada están recibiendo considerable - atención de las industrias de manufactura farmacéutica; a causa de que estos sistemas ofrecen demasiadas ventajas -

sobre los sistemas convencionales de administración de -
droga.

El presente trabajo muestra la aplicación de la -
Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para cuantificar
Maleato de Carbinoxamina, tanto en proceso como en produc-
to terminado, para una forma de liberación contro-
lada sólida oral.

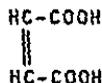
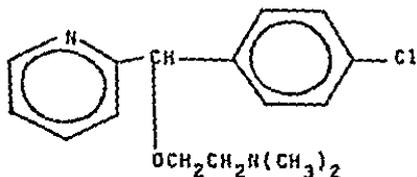
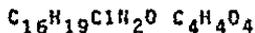
21.- GENERALIDADES.

2A.- MONOGRAFIA.- (1, 2, 3, 4, 5, 8, 15)

1. MALEATO DE CARBINOXAMINA.

Nombres Químicos y Sinónimos

- Etanoamina, 2-[(4-clorofenil)-2-piridinilmetoxi]-N,N-dimetil-(2)-2-butenodioato (1:1).
- 2-[p-cloro- α -[2-dimetilamino)etoxi]bencil]piridina maleato (1:1).
- 2-[4-cloro- α -(2-piridil)benciloxi] -N,N-dimetiletil amina hidrógeno maleato.
- Paracarbinoxamina, Rotoxamina, Levocarbinoxamina, Clistin, Ciberon, Hislosine, Lergefin, Polistin T -caps, Allergefon, Histex, Ziriton.

Fórmula Desarrollada.Fórmula CondensadaPeso Molecular

406.67

Descripción

Polvo blanco cristalino; inodoro; sabor amargo.

Preparación

Picolinaldehído y p-clorofenilmagnesiobromo bajo una reacción de Grignard produce p-cloro- α -(2-piridil)benzil alcohol. Este es convertido en su derivado alkóxido sódico con sodamina. N-dimetilaminoetil cloruro es adicionado y la mezcla es refluja para efectuar condensación y -- producir carbinoxamina. Después de aislarla y purificarla, la base es convertida a la forma maleato por reacción con ácido maléico.

Solubilidad

A 20°C, 1 gr. en 1 ml. de agua, 1.5 ml. de etanol, 1.5 ml. de cloroformo, 8300 ml. de éter.

Punto de Fusión

Entre 116° y 121°C, determinado después de secado.

Ensayos de Identidad

A: El espectro de absorción infrarrojo de una dispersión de maleato de carbinoxamina (previamente seca) en aceite mineral, exhibe máximos sólo a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de USP maleato de carbinoxamina RS.

B: El espectro de absorción ultravioleta de una solución

de maleato de carbinoxamina en metanol (1:20 000) exhibe máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda - que una solución similar de USP maleato de carbinoxamina RS, concomitantemente medida, y las respectivas absorbividades, calculadas en base seca, a la longitud de onda de máxima absorbancia que es 260 nm, no difieren en más de 3.0%.

Acidez

El pH de una solución al 1.0% (w/v) es de 4.6-5.1

pKa

8.7.

Pérdida por secado

Secada a 105°C por 2 horas: maleato de carbinoxamina pierde no más de 0.5% de su peso.

Residuo a la ignición

No más de 0.1%

Valoración

Disolver exactamente 400 mg. de maleato de carbinoxamina, previamente secada, en 50 ml. de ácido acético glacial, - adicionar 1 gota de cristal violeta TS, y titular con ácido perclórico 0.1N VS a una coloración azul-verde como punto final. Llevar a cabo la determinación de un blanco, y si es necesario hacer alguna corrección. Cada ml.

de ácido perclórico 0.1N es equivalente a 20.34 mg. de --
 $C_{16}H_{19}ClN_2O_4$

Estabilidad

Maleato de carbinoxamina es estable en soluciones acuosas a pH 1-8.

Farmacodinamia

Maleato de carbinoxamina es un potente antihistamínico - perteneciente al grupo de las etanolaminas.

Actúa por antagonismo competitivo a histamina a nivel de los sitios receptores H_1 -histamina. Presenta además ciertos efectos anticolinérgicos, antipruríticos y sedativos ligeros.

Dentro del grupo de las etanolaminas presenta una muy baja incidencia de somnolencia. La incidencia de efectos adversos gastrointestinales es baja.

Farmacocinética

Después de su administración oral es bien absorbido del tracto gastrointestinal, la respuesta clínica suele aparecer dentro de 15 a 30 minutos, es máxima dentro de 1 hora y persiste por 4-6 horas para formas de administración convencionales; para preparaciones de liberación controlada la respuesta clínica suele persistir por 8-12 horas.

Ya que el maleato de carbinoxamina es una base débil, se distribuye ampliamente en los tejidos y cruza con

facilidad las barreras hematoencefálica y placentaria.

Se elimina rápidamente por la orina, en parte sin cambio y en parte metabolizada; es transformada principalmente en el hígado por sistemas enzimáticos microsómicos.

Indicaciones

La aplicación principal de este antihistamínico es la directamente relacionada con su acción antagonista de receptores H_1 con alivio de efectos mediados en la alergia y en reacciones anafilácticas. Así resulta útil para el alivio sintomático de desórdenes alérgicos tales como rinitis alérgica estacional o perenne, rinitis vasomotor, conjuntivitis alérgica debida a alérgenos inhalados o alimentos, dermatosis alérgica, edema angioneurótico, también es útil para aliviar la severidad de reacciones alérgicas en la enfermedad del suero.

Contraindicaciones

Está contraindicada en pacientes hipersensitivos a maleato de carbinoxamina.

Contraindicada en niños prematuros y neonatos.

Reacciones adversas

Raramente encontradas son desvanecimiento, náusea, sequedad de los labios.

Precauciones

Durante su administración se puede experimentar al-
go de somnolencia; por lo tanto, se alertará al paciente_
de no realizar actividades que requieran destreza o aler-
ta.

Teratogenicidad

No se ha demostrado ninguna asociación entre el -
uso de maleato de carbinoxamina y anomalías fetales huma-
nas. Sin embargo, sería prudente evitar su uso durante -
el embarazo.

Interacción con otras drogas

Maleato de carbinoxamina tiene efectos depresantes
aditivos con alcohol y otros depresantes del Sistema Ner-
vioso Central (hipnóticos, sedantes, tranquilizantes, --
agentes antiansiedad, analgésicos, depresantes, etc.).

Los inhibidores MAO prolongan e intensifican su -
efecto anticolinérgico.

D o s i s

Adultos: 4-8 mg. 3 ó 4 veces diariamente para formas de -
liberación convencional.

8-12 mg. cada 8-12 hrs. para formas de libera-
ción controlada.

Niños mayores de 6 años: 4-6 mg. 3 ó 4 veces diariamente.

Niños de 3-6 años: 2-4 mg. 3 ó 4 veces diariamente.

Niños de 1-3 años: 2 mg. 3 ó 4 veces diariamente.

Toxicidad

Aunque tiene un margen relativamente alto de seguridad, el envenenamiento agudo es común.

La reacción de sobredosis puede variar desde depresión del Sistema Nervioso Central a estimulación, especialmente en niños, sequedad de labios, pupila fija y dilatada, rubor, etc.; irritación cerebral marcada resultando en espasmos musculares y posibles convulsiones pueden ser seguidas por coma profundo con colapso cardiorrespiratorio y muerte.

Almacenamiento

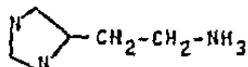
Conservar en recipientes herméticamente cerrados y protegido de la luz.

U s o

Antihistamínico.

2B.- ANTIHISTAMINICOS. (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15)

Histamina (β-imidazoliletilamina ó 1 H-imidazol-4 etanamina) fue sintetizada en 1907 antes de que su presencia en tejidos fuera reconocida.



Se ha clasificado como un autacoide, palabra derivada del griego autos= uno mismo y akos= agente medicinal.

La histamina tiene una distribución amplia, aunque irregular, en todo el reino animal y está presente en muchos venenos, secreciones nocivas, bacterias y vegetales. Casi todos los tejidos de mamíferos contienen histamina. La concentración es particularmente elevada en piel, mucosa intestinal y pulmones.

Entre las funciones fisiológicas estudiadas y reconocidas de la histamina se encuentran las siguientes:

- 1) La histamina participa en diferentes procesos fisiológicos que nada tienen que ver con las reacciones alérgicas ni traumáticas.
- 2) Histamina es un importante mediador químico en reacciones alérgicas.
- 3) La histamina probablemente juega un papel básico en el inicio de la respuesta inflamatoria de tejido a traumatismos por dilatación de capilares e incrementando su permeabilidad.

- 4) El papel de la histamina en reacciones de hipersensibilidad inmediata (antígeno-anticuerpo) es complicada - por la liberación de otros autacoídos durante tales - reacciones.
- 5) La histamina participa claramente en la regulación fisiológica de la secreción gástrica.
- 6) Hay firmes indicaciones de que la histamina sirve como transmisor o modulador químico dentro del encéfalo.
- 7) La histamina ejerce una variedad de acciones sobre el sistema cardiovascular.
- 8) Hay una importante capacidad de formación de histamina en muchos tejidos que crecen o se reparan rápidamente, como el tejido embrionario, hígado en regeneración, - médula ósea, tejido de heridas y granulación y crecimientos malignos.
- 9) Muchos compuestos, incluyendo un gran número de agentes terapéuticos, pueden estimular la liberación de - histamina. La respuesta de este tipo es más probable - que ocurra a ciertas categorías de substancias, particularmente aquellas que son bases orgánicas. Entre es tas bases están las amidas, amidinas, compuestos de - amonio cuaternario, compuestos de piridinio, piperidinas, alcaloídos y bases antibióticas.

En general, la histamina aparece como una substancia necesaria para muchos procesos fisiológicos. Probablemente la histamina tiene un papel homeostático.

Sin embargo, ciertas condiciones pueden conducir - a una excesiva producción o liberación del autacoído

coide resultando en la aparición de efectos indeseables.

Por lo tanto, estas acciones de la histamina han sido estudiadas con el propósito de desarrollar drogas que bloqueen selectivamente ciertas acciones de la histamina.

Antihistamínicos.

El término "antihistamínico" reúne un conjunto de drogas que tienen en común la propiedad de antagonizar acciones de la histamina.

Los antihistamínicos antagonizan algunos de los efectos farmacológicos de la histamina, pero no afectan la producción de anticuerpos, interacciones antígeno-anticuerpo, liberación de histamina, o las acciones de otros autacoides.

A la fecha se han identificado dos tipos de receptores de histamina como un componente de la superficie celular. El conocimiento de sus propiedades estructurales está restringido a las presunciones que puedan deducirse de estudios farmacológicos de las relaciones estructura-actividad de los agonistas y antagonistas histamínicos.

Dependiendo de los receptores con los que interactúan, los antagonistas de la histamina se clasifican como sigue:

- 1) Histamina estimula la contracción de músculo liso de varios órganos tales como intestino y bronquios. Los receptores farmacológicos que median esta respuesta son referidos como receptores- H_1 y las drogas que inhiben estas respuestas a histamina son clasificadas como antagonistas H_1 .
- 2) Histamina estimula la secreción de ácido por el estómago, incrementa la velocidad cardiaca. Los receptores que median estas acciones son conocidos como recep

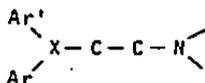
tores- H_2 . Las drogas que inhiben estas respuestas a histamina son clasificadas como antagonistas H_2 .

Ya hay indicios de que existen subpoblaciones de receptores de la histamina y parece probable una mayor elaboración de este esquema.

Relación Estructura-Actividad.

Químicamente los antihistamínicos son un grupo amplio de compuestos.

La mayoría de los compuestos que antagonizan la acción de histamina a nivel de los sitios receptores-H₁ pueden ser descritos por la siguiente estructura general:



donde: Ar es una porción cíclica (incluyendo fenil, -fenil sustituido y grupos heterocíclicos).

Ar' es una porción cíclica o grupo metil cíclico.

X la clasificación química de estos agentes antihistamínicos está usualmente basada en esta unidad X, la cual puede ser carbono saturado-oxígeno, nitrógeno, carbono.

A veces las dos porciones cíclicas están unidas en un puente, o la porción etilamina puede formar parte de una estructura anillada.

N En general, el átomo terminal N deberá ser una amina terciaria para máxima actividad farmacológica. Sin embargo, el átomo N terminal puede formar parte de una estructura heterocíclica y puede dar por resultado un compuesto de alta potencia antihistamínica.

La cuaternización del nitrógeno en la porción etilamina no siempre resulta en disminución de la actividad farmacológica del compuesto.

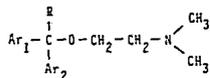
Extensiones o ramificaciones de la cadena -- 2-amino-etil resultan en una disminución de la actividad farmacológica del compuesto.

Clasificación química.

Los antihistamínicos pueden clasificarse en grupos basándose en su estructura química, como sigue:

1) Derivados de Etanolaminas o Amino alquil éteres u Oxitetilaminas.

Estructura General



Nombre Genérico

Difenhidramina

Bromodifenhidramina

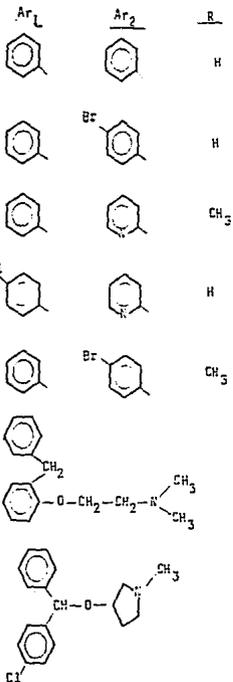
Doxilamina

Carbinoxamina

Embramina, Nefrofenhidramina

Feniltoloxamina

Piroxamina



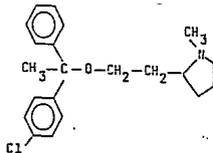
Comentarios

Las drogas en este grupo poseen significativa actividad anticolinérgica. Somnolencia es el efecto secundario común de este tipo de drogas. La incidencia de efectos secundarios gastrointestinales es baja.

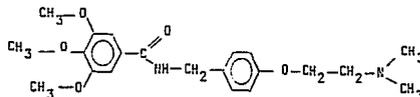
1) Derivados de Etanolaminas o Amino alquil éteres u Oxietilaminas.

Nombre Genérico

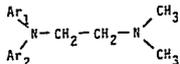
Meclastina, Clemastina



Trimetobenzamida



2) Derivados de Etilendiaminas.

Estructura General.Nombre Genérico

Pirilamina, Mepiramina,
Piransamina

Tripelamina

Metapirileno

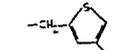
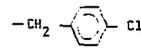
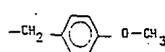
Toncilamina

Cloropiramina

Fembenzamina

Tenildiamina

Cloropirileno

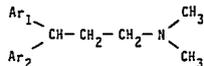
Ar₁Ar₂Comentarios

Contiene los más antiguos histamínicos usados. Son antagonistas H₁ altamente efectivos, con una relativa incidencia alta de efectos secundarios de presantes del Sistema Nervioso Central y Gastrointestinales.

3) Derivados de Propilaminas o Arilalquilaminas o Alquilaminas.

Saturados

Estructura General



Nombre Genérico

Feniramina

Clorofeniramina

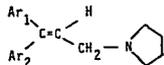
Dexclorofeniramina

Bromofeniramina

Dexbromofeniramina

No Saturados

Estructura General



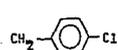
Tripolidina

Pirrobutamina

Ar₁



Ar₂



Comentarios

20

Figuran entre los agentes bloqueadores H₁ más potentes y en general son efectivos en dosis relativamente bajas.

No son tan propensas a producir somnolencia, figuran entre los agentes más apropiados para uso diurno.

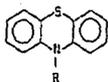
Los efectos secundarios de estimulación al Sistema Nervioso Central son más comunes en este grupo que en otros.

Es el enantiómero dextrorrotatorio de Clorofeniramina.

Es el enantiómero dextrorrotatorio de Bronofeniramina.

4) Derivados de Fenotiazinas

Estructura General



Nombre Genérico

Prometacina

Trimepracina

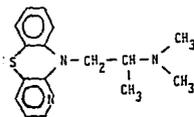
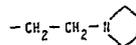
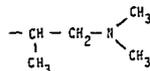
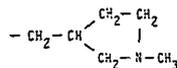
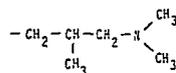
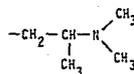
Metdilacina

Isoprometacina

Piratiacina

Isotiopendil

R



Comentarios

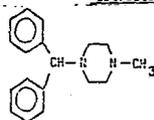
21

Las drogas de este grupo poseen considerable actividad anticolinérgica.

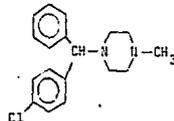
5) Derivados de Piperazina

Nombre GenéricoEstructuraComentarios

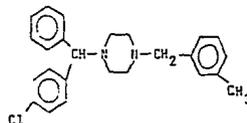
Ciclicina.



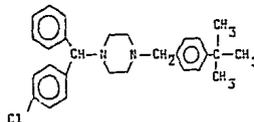
Clorociclicina



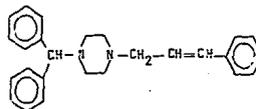
Meclicina



Buclicina



Cinaricina

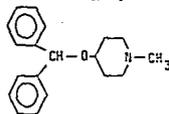


La actividad de los antihistámicos tipo Piperazina está caracterizada por una gran diversidad de acción. Son anti-histámicos moderadamente potentes con una muy baja incidencia de somnolencia. Además de la actividad anti-histáminica presentan la propiedad antiemética.

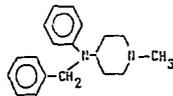
6) Derivados de Piperidina

Nombre Genérico

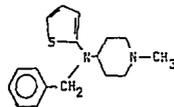
Difenilpiralina

Estructura

Banipina



Tenalidina

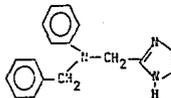
Comentarios

Además de la acción antihistamínica, todas tienen acción anti-nauseosa y son eficaces para aliviar el mareo.

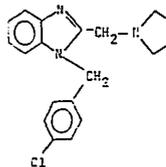
7) Derivados de Imidazolina

Nombre Genérico

Antazolina

Estructura

Clemizol

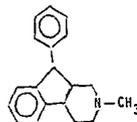


Nombre Genérico

Estructura

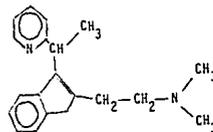
Comentarios

Fenindamina

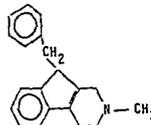


Las drogas de este grupo es -
 menos probable que causen ac-
 ción sedante o somnolencia -
 que otros tipos de antihista-
 mínicos.

Dimetindeno



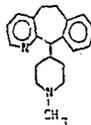
Mebhidrolina



9) Misceláneo

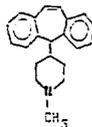
Nombre GenéricoEstructuraComentarios

Azatadina

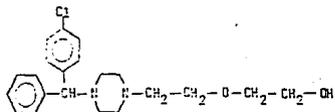


El grupo misceláneo de compuestos incluye aquellos agentes que exhiben actividad antihistamínica pero no pertenecen convencionalmente a una clase química.

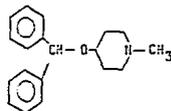
Ciproheptadina



Hidroxizina



Difenilpiralina



Los clínicos difieren en opinión acerca del valor de tantos antihistamínicos; algunos consideran que cada droga tiene sus ventajas y otros creen que hay una réplica innecesaria de drogas que substancialmente poseen la misma acción. Desafortunadamente hay muy pocos estudios comparativos cuidadosamente controlados con los cuales establecer un juicio efectivo.

Farmacocinética.

Los antagonistas- H_1 pueden definirse como aquellas drogas, las cuales en concentraciones bajas, inhiben competitivamente la acción de histamina sobre tejido conteniendo receptores H_1 .

Los bloqueadores H_1 se absorben bien del tracto gastrointestinal. Después de la administración oral, los efectos aparecen dentro de 15-30 minutos, son máximos dentro de una hora, y persisten por 4-6 horas. El efecto terapéutico de preparaciones de liberación controlada puede persistir por 8-12 horas.

Cruzan con facilidad las barreras hematoencefálicas y placentaria. No hay información sobre la concentración de estas drogas en piel y mucosas.

Su lugar de metabolismo es el hígado, los bloqueadores H_1 están entre las muchas drogas que inducen a las enzimas microsomales hepáticas y pueden facilitar su propio metabolismo.

Son excretadas principalmente por el riñón, en parte sin cambio y en parte como metabolitos.

Deberán administrarse después de los alimentos para evitar irritación gástrica.

Acciones Farmacológicas.

Casi todos los bloqueadores H_1 tienen acciones farmacológicas y aplicaciones terapéuticas semejantes y pueden explicarse en forma conjunta para mayor comodidad.

Los antihistamínicos previenen más bien que invertir los efectos de histamina por competición con los sitios receptores. Bloqueando los efectos de histamina, los antihistamínicos dan alivio paliativo de síntomas -- alérgicos.

A causa de que los antihistamínicos son estructuralmente similares a atropina, todos los antihistamínicos producen efectos periféricos atropina-similar, así como efectos anticolinérgicos.

Dependiendo del compuesto, dosis y sensibilidad del paciente, los antihistamínicos pueden estimular o deprimir el Sistema Nervioso Central.

Algunos antihistamínicos tienen propiedades antieméticas, algunos suprimen vértigo y temblor, y la mayoría tiene actividad anestésica local.

Usos Terapéuticos.

Las drogas bloqueadoras H_1 ocupan un lugar seguro y valioso en el tratamiento sintomático de diversas enfermedades alérgicas, donde su utilidad puede atribuirse al antagonismo de la histamina endógena liberada, uno de los varios autacoides que en conjunto producen la respuesta alérgica.

La mayoría de estos agentes son efectivos en Rinitis Alérgica Estacional o Perenne, Rinitis Vasomotor, Conjuntivitis Alérgica, Urticaria y Angioedema, Reacciones alérgicas a sangre y plasma, y como coadyuvantes a la terapia convencional en reacciones anafilácticas.

Reacciones Adversas.

El más común efecto adverso de antihistamínicos, - y el único común a todas las drogas de este grupo, es la sedación, evidenciado principalmente por somnolencia y - disminución de la habilidad para concentrarse.

Otras reacciones desfavorables imputables al Sistema Nervioso Central son mareos, tinnitus, cansancio, in-- coordinación, fatiga, visión borrosa, diplopia, euforia, intranquilidad, insomnio, temblor.

Los efectos secundarios más frecuentes después de los mencionados afectan el tracto gastrointestinal e in-- cluyen anorexia, náuseas, vómitos, dificultades epigástri-- cas y estreñimiento o diarrea.

Otros efectos secundarios son sequedad de la boca_ y vías respiratorias.

Las complicaciones hematológicas graves, como leu-- copenia, agranulocitosis y anemia hemolítica, son muy - raras.

Contraindiciones.

Hipersensibilidad a antihistamínicos.

No se usan en recién nacidos o niños prematuros.

Los antihistamínicos están contraindicados en pacientes que están siendo tratados con inhibidores de monoamino oxidasa, o que han sido tratados con tales drogas dentro de dos semanas precedentes.

Los antihistamínicos deberán ser administrados con precaución en pacientes con disfunción renal o hepática, hipertrofia prostática, obstrucción piloroduodenal, glaucoma.

La administración de antihistamínicos en niños menores de 6 años se hará sólo bajo estricta supervisión médica.

Interacciones.

Los antihistamínicos tienen efectos depresantes - aditivos con alcohol y otros depresantes del Sistema Nervioso Central (tranquilizantes, hipnóticos y sedantes).

Los Inhibidores MAO prolongan e intensifican - los efectos anticolinérgicos de histamínicos.

Precauciones.

Los antihistamínicos pueden causar somnolencia y - disminución de alerta mental. Pacientes bajo tratamiento con estas drogas no deberán tener a su cargo vehículos u otro medio de transporte o maquinaria donde la pérdida de atención pueda producir accidentes.

Los pacientes deberán abstenerse de tomar bebidas alcohólicas.

Teratogenicidad.

No se ha demostrado ninguna asociación entre el - uso de tales bloqueadores H_1 y anomalías fetales humanas. Sin embargo, sería prudente evitar tales drogas durante - el embarazo, especialmente en el primer trimestre.

Envenenamiento.

Aunque las drogas bloqueadoras H_1 tienen un margen relativamente alto de seguridad, el envenenamiento agudo es común.

En niños, el síndrome de envenenamiento incluye - alucinaciones, excitación, ataxia, incoordinación, convulsiones, midriasis fija, rubor facial, fiebre, taquicardia, retención urinaria y sequedad de la boca.

En la etapa terminal hay coma profundo con colapso cardiorrespiratorio y muerte. En el adulto no hay generalmente fiebre ni rubor.

No hay tratamiento específico para el envenenamiento con bloqueadores H_1 y el tratamiento es de sostén y sintomático general.

2C.- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. (10)

Se podría definir la validación como la determinación del grado de validez de un proceso de medición.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

A la fecha los conceptos de "control total de calidad" y de "validación" son, sin lugar a dudas, herramientas que nos permiten conocer mejor nuestros productos y los factores que afectan su calidad, de tal manera que cuando se aplican adecuadamente, nos llevan a lograr lo que ha sido objetivo primordial de todo fabricante de medicamentos, y que es asegurar que cada unidad de dosificación elaborada cumpla con las características de calidad diseñadas. Dicho de otra manera, estos conceptos nos permiten "construir la calidad" en lugar de "tratar de controlarla".

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método analítico satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

La validación de un método analítico incluye una evaluación de los siguientes parámetros:

- 1) Linealidad y Precisión del Sistema.
- 2) Especificidad.

- 3) Precisión y Exactitud del Método.
- 4) Reproducibilidad.
- 5) Estabilidad de la muestra analítica.

DEFINICIONES.-

LINEALIDAD. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango.

RANGO. El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.

EXACTITUD. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

PRECISION. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad.

bilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las - condiciones normales de operación.

a) REPETIBILIDAD.- Es la precisión de un método - analítico expresado como la concordancia obtenida entre - determinaciones independientes realizadas por un solo ana- lista, usando los mismos aparatos y técnicas.

b) REPRODUCIBILIDAD.- Es la precisión de un méto- do analítico expresada como la concordancia entre deter- minaciones independientes realizadas por diferentes ana- listas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes - laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

ESPECIFICIDAD. - Es la medida del grado de inter- ferencias (o ausencia de), en el análisis de muestras com- plexas. Es la habilidad de un método analítico para obte- ner una respuesta debida únicamente a la sustancia de in- terés y no a otros componentes de la muestra.

TOLERANCIA.- La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados análiti- cos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo - modificaciones de las condiciones normales de operación , tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, - columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

GLOSARIO.-

- b = Ordenada al origen o intercepto
 r = Coeficiente de Determinación
 r^2 = Coeficiente de Correlación
 CV = Coeficiente de Variación
 S = Sumatoria
 m = Pendiente
 n = Número de replicaciones
 t = Número de diluciones o número de cantidades adicionadas
 \bar{y} = Media aritmética
 N = Número total de determinaciones
 DE = Desviación Estándar
 x = Dilución o cantidad adicionada
 y = Propiedad medida o cantidad recuperada
 R = Por ciento recuperado
 \bar{R} = Promedio aritmético del por ciento recuperado
 t = Valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0,975
 S_m^2 = Varianza del método
 S_a^2 = Varianza del analista
 $S_{d/a}^2$ = Varianza del día/analista
 t^* = Valor de la distribución t de Dunnett con una probabilidad acumulada de 0,975
 S_p^2 = Varianza ponderada
 $LSIC$ = Límite superior del intervalo de confianza al 95%
 $LIIC$ = Límite inferior del intervalo de confianza al 95%
 DEp = Desviación estándar ponderada

g_1 = grado de libertad

S_E^2 = Varianza del error de regresión

S_{dm}^2 = Varianza de la diferencia de pendientes

S_{do}^2 = Varianza de la diferencia de ordenadas.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se determina, construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para propósitos de control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluido el 100% de la dosis.

CRITERIO:

$$b \approx 0, \quad r \geq 0.99, \quad r^2 \geq 0.98$$

LINEALIDAD DEL SISTEMA

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

| <u>Dilución de la solución patrón (x)</u> | <u>Propiedad medida (y)</u> |
|---|-------------------------------|
| x_1 | $y_{11}, y_{12} \dots y_{1n}$ |
| x_2 | $y_{21}, y_{22} \dots y_{2n}$ |
| - | - - - |
| - | - - - |
| x_t | $y_{t1}, y_{t2} \dots y_{tn}$ |

t = número de diluciones.

n = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución, sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares:

$$Sx = n(x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$Sx^2 = n(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$Sy = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$sy^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$S_{xy} = x_1(y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2(y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots \\ + x_t(y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

$$m = \frac{nt(S_{xy}) - (S_x)(S_y)}{nt(S_x^2) - (S_x)^2}$$

3) Cálculos finales:

$$b = \frac{S_y - m(S_x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[nt(S_x^2) - (S_x)^2][nt(S_y^2) - (S_y)^2]}$$

PRECISION DEL SISTEMA

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

CRITERIO:

$$CV \leq 1.5\%$$

PRECISION DEL SISTEMA

1) Tabular los resultados.

$$y_1, y_2, y_3, \dots, y_N$$

2) Cálculos preliminares:

$$S_y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_N$$

$$S_y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_N^2$$

$$\bar{y} = \frac{S_y}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N(S_y^2) - (S_y)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

3) Cálculos finales:

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

LINEALIDAD DEL METODO

Se determina con placebos adicionados del principio activo, (placebos cargados) cada uno de manera independiente, cuando menos a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100%, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (Control de Calidad y Estabilidad) y preferentemente deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

CRITERIO

Cantidad adicionada VS. cantidad recuperada:

$$m \approx 1, \quad b \approx 0, \quad r^2 \geq 0.98$$

Porcentaje recuperado: en el IC para la media, debe localizarse el 100%.

El Coeficiente de Variación (CV) dependerá del tipo de método y la muestra; hay que tomar en cuenta la forma farmacéutica y la concentración.

| METODO | CV |
|---------------------------------|------|
| Cromatográficos | ≤ 2% |
| Químicos y Espectrofotométricos | ≤ 3% |
| Microbiológicos | ≤ 5% |

NOTA: Para métodos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos la amplitud del estudio dependerá de las cantidades mínimas y máximas esperadas.

LINEALIDAD DEL METODO

A. Cantidad Adicionada - Cantidad Recuperada.

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

| <u>Cantidad Adicionada (x)</u> | <u>Cantidad Recuperada (y)</u> |
|--------------------------------|---------------------------------|
| x_1 | $y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n}$ |
| x_2 | $y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n}$ |
| - | - - - - |
| x_t | $y_{t1}, y_{t2}, \dots, y_{tn}$ |

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares:

$$S_x = n(x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$S_x^2 = n[(x_1)^2 + (x_2)^2 + \dots + (x_t)^2]$$

$$S_y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$S_y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$S_{xy} = x_1(y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2(y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t(y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

3) Cálculos finales:

$$m = \frac{nt(S_{xy}) - (S_x)(S_y)}{nt(S_x^2) - (S_x)^2}$$

$$b = \frac{S_y - m(S_x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[nt(S_x^2) - (S_x)^2][nt(S_y^2) - (S_y)^2]}$$

B. Porcentaje Recuperado.

Calcular el porcentaje recuperado (R) por cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = (y/x) 100$$

1) Tabular los resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

2) Cálculos preliminares:

$$SR = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_N$$

$$SR^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_N^2$$

$$\bar{R} = (SR)/N$$

$$DE = \left[\frac{N(SR^2) - (SR)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

3) Cálculos finales:

Intervalo de confianza para la media:

$$\bar{R} \pm t \cdot \frac{DE}{N^{1/2}}$$

t = valor de la t de Student, con $N-1$ grados de libertad, y una probabilidad acumulada de 0.975.

Coefficiente de Variación:

$$CV = (DE/\bar{R}) 100$$

EXACTITUD AL 100%

Se debe cuando menos analizar 6 placebos cargados con el 100% del principio activo, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de trabajo.

CRITERIO

El intervalo de confianza para la media, debe incluir el 100%.

El Coeficiente de Variación debe cumplir con los criterios establecidos en la linealidad del método.

NOTA: Si en el momento de hacer la linealidad del método se trabajan diferentes concentraciones cuando menos por quintuplicado, la exactitud del método se puede determinar de los valores de linealidad.

EXACTITUD AL 100%

- 1) Tabular los resultados del porciento recuperado (R), -
con base al siguiente formato:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

- 1) Cálculos preliminares:

$$SR = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_N$$

$$SR^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_N^2$$

$$\bar{R} = \frac{SR}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N(SR^2) - (SR)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

- 3) Cálculos finales:

Intervalo de confianza para la media:

$$\bar{R} \pm t \cdot \frac{DE}{N^{1/2}}$$

t = valor de t de Student con N-1 grados de libertad y -
una probabilidad acumulada de 0.975

Coefficiente de Variacion:

$$CV = (DE/\bar{R}) 100$$

PRECISION (REPRODUCTIBILIDAD)

Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado cada muestra.

Trabajar de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica.

CRITERIO

El CV total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado.

| METODO | CV |
|---------------------------------|------|
| Cromatográficos | ≤ 2% |
| Químicos y Espectrofotométricos | ≤ 3% |
| Microbiológicos | ≤ 5% |

PRECISION (REPRODUCTIBILIDAD)

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen 2 días, 2 analistas, y 3 determinaciones.

Cuando se utilice un número distinto de días y/o analistas y/o recobros por analista y día, se sugiere que se consulte a un estadístico.

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

| | | ANALISTA | |
|-----|---|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 |
| DIA | 1 | y_{111} | y_{211} |
| | | y_{112} | y_{212} |
| | | y_{113} | y_{213} |
| | 2 | y_{121} | y_{221} |
| | | y_{122} | y_{222} |
| | | y_{123} | y_{223} |

2) Cálculos preliminares:

$$y \dots = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$Sy^2 = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$\bar{y} = y \dots / N$$

$$DE = \left[\frac{N(Sy^2) - (y \dots)^2}{N(N - 1)} \right]^{1/2}$$

N = número total de determinaciones (en este caso específico N=12)

3. Cálculos finales:

Coefficiente de Variación:

$$CV = (DE/\bar{y}) 100$$

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

Si se desea determinar la reproducibilidad interanalista, interdia/analista, y la repetibilidad es necesario efectuar el siguiente procedimiento:

1) Cálculos preliminares:

$$y_{11} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$$

$$y_{12} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$$

$$y_{22} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$Sy_{d/a}^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2$$

$$y_1 = y_{11} + y_{12}$$

$$y_2 = y_{21} + y_{22}$$

$$Sy_a^2 = y_1^2 + y_2^2$$

Varianza debida al método:

$$S_m^2 = \frac{Sy^2 - (Sy_{d/a}^2)/3}{8}$$

Varianza debida al dfa/analista:

$$S_{d/a}^2 = \frac{(Sy_{d/a}^2)/3 - (Sy_a^2/6)}{6} - \frac{Sy^2 - (Sy_{d/a}^2)/3}{24}$$

Varianza debida al analista:

$$S_a^2 = \frac{(Sy_a^2)/6 - (y\dots)^2/12}{6} - \frac{(Sy_{d/a}^2)/3 - (Sy_a^2)/6}{12}$$

2) Cálculos finales:

$$\text{Repetibilidad } \pm 1.96 (S_m^2)^{1/2}$$

$$\text{Reproducibilidad interdia/analista } \pm 1.96 (S_{d/a}^2)^{1/2}$$

$$\text{Reproducibilidad interanalista } \pm 1.96 (S_a^2)^{1/2}$$

Si:

i) S_a^2 es menor o igual a cero y $S_{d/a}^2$ es menor o igual a cero, entonces

$$S_a^2 = S_{d/a}^2 = S_m^2$$

ii) $S_{d/a}^2$ es menor o igual a cero, entonces $S_{d/a}^2 = S_m^2$

iii) S_a^2 es menor o igual a cero, entonces $S_a^2 = S_{d/a}^2$

ESPECIFICIDAD

- 1.- Analizar placebos del producto con el método propuesto.
- 2.- Identificar las respuestas de los activos, excipientes (en caso de tenerla), y de otras sustancias auxiliares.
- 3.- En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras con placebo "añadido" de éstos y la sustancia de interés y se analizan con el método propuesto.

CRITERIO

Confirmar que el método desarrollado es capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

Se determina mediante el análisis, por triplicado, de una muestra homogénea trabajados de manera independiente.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas - condiciones (ej. temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista.

Reanalizar las muestras bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico.

La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

CRITERIO

La muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

- 1) Tabular los resultados con base al siguiente formato -
y calcular los resultados indicados:

| | CONDICION/TIEMPO | | | |
|---------|------------------|-------|-----------|--|
| INICIAL | 1 | 2 | m | |
| y_1 | y_4 | y_7 | y_{N-2} | |
| y_2 | y_5 | y_8 | y_{N-1} | |
| y_3 | y_6 | y_9 | y_N | |

- 2) Cálculos preliminares:

| | | | | |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| MEDIA | \bar{y}_0 | \bar{y}_1 | \bar{y}_2 | \bar{y}_M |
| VARIANZA | S_0^2 | S_1^2 | S_2^2 | S_m^2 |

Varianza ponderada

$$S_p = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2 + 2S_2^2 + \dots + 2S_m^2}{2(m+1)}$$

- 3) Cálculos finales:

Para cada condición * tiempo:

$$IC = (\bar{y}_M - \bar{y}_0) \pm \underline{t} \times \left(S_0^2 \times \frac{2}{3} \right)^{1/2}$$

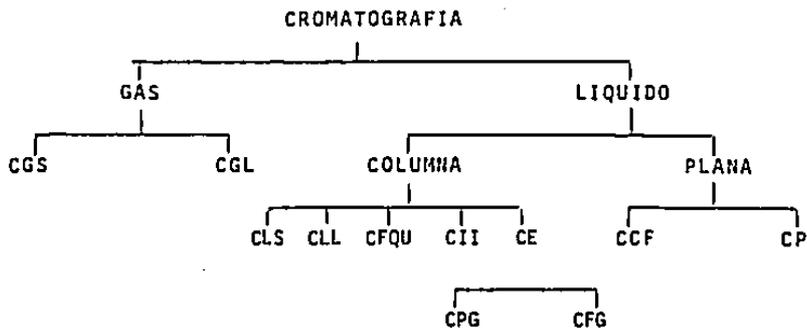
donde: \underline{t} = valor de la t de Dunnet con m comparaciones y 2(m+1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

2.D.- CROMATOGRAFIA (16, 17, 18, 19, 20)

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases. Una fase se denomina estacionaria, la cual puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido. La otra fase se mueve a través de la fase estacionaria, ésta se denomina fase móvil.

Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir distintos tipos de cromatografía, tal como se indica en la figura:



donde:

- CGS : Cromatografía gas-sólido
- CGL : Cromatografía gas-líquido
- CLS : Cromatografía líquido-sólido
- CLL : Cromatografía líquido-líquido
- CFQU : Cromatografía de fase químicamente unida
- CII : Cromatografía de intercambio iónico
- CE : Cromatografía de exclusión.
- CPG : Cromatografía de permeación en gel.
- CFG : Cromatografía de filtración en gel
- CCF : Cromatografía de capa fina
- CP : Cromatografía en papel.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

No fue sino hasta 1968 que se produjo un avance - considerable en la Cromatografía líquida; este avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones - de operación y de sistemas de detección continua. Lo -- cual fructificó en una nueva expansión de la moderna cromatografía líquida en columna, actualmente conocida como Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, acrónimo_ del inglés High Performance Liquid Chromatography).

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia se caracteriza por:

1. Requerimientos de la muestra: soluble.
2. Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2-5 mm).
3. Tipos de muestras: moléculas orgánicas e inorgánicas - de peso molecular intermedio y alto.
4. Rellenos de columnas de partículas muy pequeñas (5-50 μ).
5. Presiones de trabajo relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil.
6. Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de - grandes cantidades.
7. Detectores continuos especiales, capaces de operar a - caudales muy bajos y de detectar cantidades muy pequeñas.
8. Cantidad mínima detectable del orden de 10^{-6} - 10^{-12} gr.
9. Instrumentos normalizados y automatizados.
10. Análisis rápidos.
11. Alta resolución.

Entre estas características se eligió inicialmente la presión como criterio principal de la moderna cromatografía líquida, que por ello se denominó Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC, acrónimo del inglés High - Pressure Liquid Chromatography). Sin embargo, se trata de un término poco afortunado, ya que parece indicar que la mejora lograda en la eficiencia se debe primordialmente a la elevada presión, lo cual no es en realidad así. Ciertamente, se necesita una determinada presión para alcanzar un caudal de fase móvil preestablecido; sin embargo, la presión constituye un factor negativo que no contribuye a mejorar la separación. En reconocimiento de este hecho, hoy en día muchos cromatografistas denominan a esta técnica, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, lo cual aún permite el uso de las siglas HPLC (acrónimo del inglés High Performance Liquid Chromatography).

Ventajas y limitaciones de la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

Al igual que toda técnica analítica la HPLC tiene algunas limitaciones, las cuales, junto con sus ventajas, se pueden apreciar en la siguiente tabla:

| VENTAJAS | LIMITACIONES |
|----------------------------------|------------------------------|
| Velocidad de análisis | Instrumentación costosa |
| Alta resolución | Difícil análisis cualitativo |
| Exactos resultados cuantitativos | Elevado costo de operación |
| Buena sensibilidad | No existe detector universal |
| Automatización | Experiencia indispensable. |
| Amplio espectro de aplicaciones | |

Mecanismos de separación de diferentes formas de cromatografía líquida.

Hay cinco métodos o formas de realizar la cromatografía líquida de alta eficiencia, cada una basada en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra.

- Cromatografía líquido-líquido (reparto)
- Cromatografía líquido-sólido (adsorción)
- Cromatografía de fase químicamente unida
- Cromatografía líquida por exclusión
- Cromatografía por intercambio iónico.

Más recientemente, la cromatografía de pares iónicos (combinaciones específicas de los tipos de partición y de intercambio iónico) se ha establecido como otro modo importante.

También puede clasificarse las técnicas de cromatografía líquida de acuerdo con la naturaleza de la fase -- móvil. Teniendo en cuenta su polaridad en relación con la de la fase estacionaria, encontrándose dos tipos distintos:

- 1) La llamada cromatografía en fase normal (hacia adelante), en la que la fase estacionaria es de naturaleza - fuertemente polar y la fase móvil es apolar.
- 2) Cromatografía de fase inversa, en la que la fase estacionaria es de naturaleza apolar, mientras la fase móvil es un líquido polar.

También podemos considerar una clasificación de --

acuerdo a la composición de la fase móvil:

- 1) Si se mantiene constante a lo largo de un cromatograma, se habla de una elución isocrática.
- 2) Si se varía su composición a lo largo de un cromatograma se denomina elución por gradiente.

CROMATOGRAFIA DE FASE QUIMICAMENTE UNIDA.

Esta técnica cromatográfica surgió como consecuencia de los problemas asociados con la cromatografía líquido-líquido. Dado que su fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte (generalmente sílica), la fase móvil difícilmente produce deterioro alguno en la columna.

La sílica es un sustrato reactivo a la cual varios grupos funcionales pueden ser unidos. Los grupos funcionales más usados unidos a la superficie de sílica son los grupos: alquil C_8 , alquil C_{18} , fenil aromático, ciano.

Uniendo la sílica con un grupo funcional "no polar" se altera la superficie química de la partícula a una forma "no polar".

La disponibilidad de una extensa variedad de grupos funcionales en materiales de empaque permiten tanto cromatografía en fase normal como cromatografía en fase inversa.

Adicionalmente, las elecciones entre materiales de empaque y las fases móviles que pueden ser usadas con estos materiales de empaque son suficientemente flexibles para permitir casi cualquier separación por esta técnica cromatográfica.

Por desgracia la cantidad de fase estacionaria que es posible unir a la superficie de un soporte (generalmente sílica) es limitada y como consecuencia los tamaños de muestra separados en esta columna son necesariamente re-

ducidos, por lo común menor de 1 mg.

A medida que el número de materiales posibles de estudiar mediante esta técnica ha ido en aumento, su popularidad ha crecido y hoy en día es quizá la que más se utiliza.

FASES QUÍMICAMENTE UNIDAS DE UTILIZACIÓN MÁS FRECUENTE.

En la siguiente figura se agrupan los materiales - de empaque de varios tipos de fases químicamente unidas, - más comúnmente usadas:

| TIPO | FUNCIONALIDAD | ESTRUCTURA DEL GRUPO UNIDO COVALENTEMENTE |
|--------------|-----------------|--|
| Fase Normal | Amino | $-\text{NH}_2$ |
| | Ciano (nitrilo) | $-\text{CN}$ |
| | Diol | $\begin{array}{c} \text{Si}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{Si}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{Si}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$ |
| Fase Inversa | Dimetilsililo | $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ |
| | Octilsililo | $\text{Si}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ |
| | Octadecilsililo | $\text{Si}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_3$ |
| | Fenilsililo | $\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ |

CROMATOGRAFIA DE FASE QUIMICAMENTE UNIDA EN FASE INVERSA.

La mayoría de las separaciones por HPLC actualmente son llevadas a cabo usando cromatografía de fase químicamente unida en fase inversa. Los materiales de empaque en este tipo de cromatografía son más rápidos a equilibrar y tienen más versatilidad de superficie química que la superficie de sílica.

El mecanismo de separación sobre fase enlazada en fase inversa, no es reparto puro. De hecho algunos investigadores prefieren usar la denominación "adsorción en fase inversa". Otros opinan que operan simultáneamente tres mecanismos: adsorción, reparto y tensión superficial.

Se sugiere una posible explicación a la gran capacidad de separación de las columnas de fase inversa. Estas separaciones pueden verificarse gracias a las propiedades de tensión superficial del material de empaque. Para grandes concentraciones de agua en la fase móvil, las fuerzas de tensión superficial entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria tienden a ser muy elevadas. Al aumentar la cantidad de sustancia orgánica añadida a la fase móvil, la unión de la muestra con la fase estacionaria debida a fuerzas de tensión superficial se debilita eluyéndose los componentes de la muestra.

El tipo de grupo químico, su cantidad de carbonos, tamaño de poro y tamaño de partícula son los principales factores que diferencian los materiales de empaque usados para fase reversa.

La selección de un particular material de empaque

para fase reversa es una función de la polaridad de la muestra, su solubilidad en fases móviles acuosas/orgánicas, y su carga; en adición a la eficiencia, selectividad y capacidad necesaria para llevar a cabo la separación.

Algunos principios de esta técnica son listados en la siguiente figura:

Fases estacionarias: C_2, C_8, C_{18} , fenilo, permamente unidos al soporte de sílica.

- a) totalmente poroso, 5-10 m^{μ} de diámetro de partícula.
- b) pelicular (capa porosa), aproximadamente 35 m^{μ} de diámetro de partícula.

Fases móviles: agua
soluciones buffer
metanol
acetonitrilo
isopropanol
y mezclas de ellos.

La velocidad de elución se incrementa con disminución de la polaridad.

Usado para com puestos con: Moderada a alta polaridad, solubles en -- agua o solventes polares.

La retención se basa en: Estructura del hidrocarburo (alquil sustituido, número y posición de dobles enlaces, estructura anillada)
grupos funcionales polares,
tamaño molecular.

FASE MOVIL.

La estabilidad de los materiales de empaque de -- las fases químicamente unidas es determinada por el soporte de sílica. Consecuentemente, se pueden usar fases móviles que estén dentro del rango de pH 2-8.5.

En la cromatografía sobre fase inversa con fases químicamente unidas la fase móvil más habitual es una mezcla de agua con un disolvente miscible y menos polar, como metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc. El agua es el disolvente "más débil", y origina los mayores tiempos de retención. Al aumentar la concentración del disolvente menos polar disminuyen los tiempos de retención.

La elección del componente menos polar de la fase móvil depende de diversos factores, principalmente de la solubilidad de la muestra, compatibilidad fase móvil-muestra-detector, viscosidad de la fase móvil y eficiencia del equipo utilizado.

En lo que atañe a las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía de fase químicamente unida en fase inversa, cabe citar:

- disolver la muestra
- no degradar o disolver la fase estacionaria
- tener baja viscosidad
- ser compatible con el tipo de detector utilizado
- tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.

El caudal óptimo para columnas de fase enlazada es de 0.5-2 ml/mn para las columnas de 2.6 mm de diámetro -

interno, y de 1-4 ml/mn para las de 4.6 mm de diámetro interno.

La presencia de partículas extrañas en la fase móvil es comúnmente un gran problema, ya que éstas pueden acumularse en la columna incrementando la presión; también pueden dañarse los sellos de la bomba y válvulas. Consecuentemente los solventes orgánicos, agua, soluciones buffer y otros constituyentes de la fase móvil deberán ser pasados a través de un filtro de 0.45 μ antes de que sean utilizados.

Si se usa un sistema para mezclar fases móviles de 2 o más recipientes se deberá determinar anticipadamente que los componentes no forman emulsiones o precipitan en el mezclado.

Otro problema que se presenta es una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se degasifican dentro del instrumento y forman burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector, causando ruido o aparición de picos fantasma en la señal. Una forma de eliminar esto es aplicar vacío sobre el recipiente que contiene la fase móvil, mientras se agita la muestra con un agitador magnético.

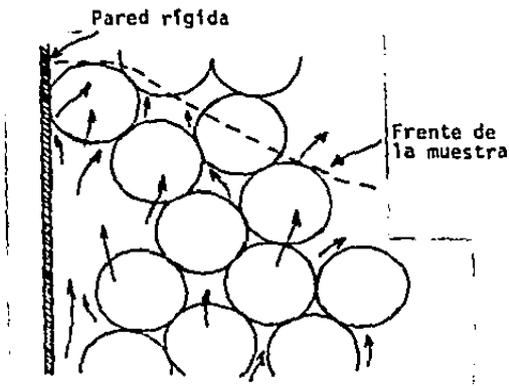
Un punto importante a tomarse en cuenta es que los reactivos constituyentes de la fase móvil, deben ser de alta pureza, usualmente grado cromatográfico.

Tecnología de compresión radial.

Técnicamente, la eficiencia de una columna de pared rígida es menor que la alcanzada con el uso de una columna de pared flexible y tecnología de compresión radial.

Con columnas de pared rígida la dispersión de la fase móvil cerca de la pared de la columna es mayor que en el centro de la columna. Este fenómeno ha sido llamado como el "efecto pared".

Si uno ve este efecto desde el punto de vista de un corte perpendicular a través de la columna, la permeación del eluente será a través de varios canales y espacios, (ver la figura 1). Así, a diferentes posiciones en la corriente del flujo, hay diferentes velocidades causadas por las diferentes permeabilidades locales a través de estos canales. Debido a esta heterogenicidad local, la travesía de la banda del soluto no es uniforme, en estructuras de pared rígida. Esto constituye una significativa fuente de ensanchamiento de banda para columnas cromatográficas de pared rígida.



La técnica de compresión radial tiende a eliminar este "efecto pared" por la aplicación de presión (compresión) a lo largo de los ejes axiales de un tubo flexible, conteniendo el material de empaque; la pared de la columna se amolda alrededor del material de empaque (y disminuyen los espacios vacíos dentro del empaque), dando una estructura de empaque más homogénea, con lo cual se incrementa la eficiencia de la columna, (ver la figura 2).

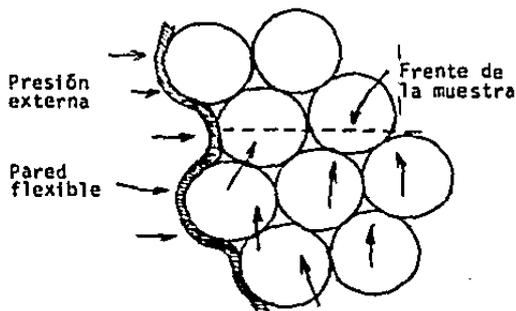


FIG. 2

A causa de que la compresión radial da una estructura de empaque reproducible y una permeabilidad uniforme y homogénea, que no se observa en columnas de acero inoxidable con partículas de equivalente tamaño y dimensiones, el efecto pared y los prevaletientes problemas de los canales a través de la columna y el de los espacios vacíos pueden ser eliminados efectivamente.

La eliminación de estos fenómenos y mejoramiento de la estructura del empaque, resultan en una reproducibilidad de la eficiencia de la columna, así como en un in--

cremento de la vida útil de la columna.

Parámetros cromatográficos.

El lenguaje común en cromatografía líquida utiliza algunos términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental; a continuación se dan los más utilizados, indicando en los casos pertinentes su importancia operativa y la forma en que son evaluados, (ver la figura 3).

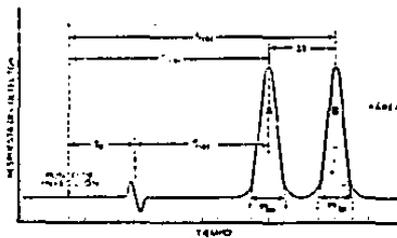


Fig. 3. Cromatograma típico.

1. Tiempo de retención (T_r).- Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura. Se expresa en segundos.
2. Tiempo muerto (T_m).- Es el tiempo requerido para eluir una sustancia no retenida en la columna.
3. Tiempo de retención ajustado (T_r'). Es la diferencia entre T_r y T_m , es decir, T_r es el tiempo total de per-

manencia en la columna, T_m es el tiempo que la sustancia permanece en la fase móvil; por lo tanto T_r' es el tiempo que la sustancia permanece retenida en la fase estacionaria.

$$T_r' = T_r - T_m$$

4. Anchura de la base de las señales (W_b). Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a - ambos lados de una señal cromatográfica. Este valor - de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.
5. Número de platos teóricos (N). El número de platos - teóricos es una medida de la eficiencia de la columna - y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N , más eficiente será la columna.

N se mide de acuerdo con la fórmula:

$$N = 16 \left(\frac{T_r}{W_b} \right)^2$$

donde T_r y W_b se expresan en las mismas unidades (tiempo, volumen, distancia, etc.).

6. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT). Se representa por:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

donde L es la longitud de la columna, expresada habitualmente en milímetros.

Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un

mayor número de platos por unidad de longitud y, por tanto, la columna será más eficiente.

7. Velocidad lineal promedio de la fase móvil (\bar{u}). Se expresa por:

$$\bar{u} = \frac{L}{T_m}$$

Este parámetro de operación se usa cuando se representa esquemáticamente AEPT en función de \bar{u} (gráficas de Van Deemter).

8. Coeficiente de distribución o de reparto (k). Se expresa por:

$$k = \frac{\text{cantidad de muestra/mililitro de fase estacionaria}}{\text{cantidad de muestra/mililitro de fase móvil}}$$

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característica de cada compuesto y del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y también es función de la temperatura.

9. Relación de fases (B). Se representa por:

$$B = \frac{\text{mililitros de fase móvil}}{\text{mililitros de fase estacionaria}}$$

Este parámetro expresa que, por cada sección de columna, equivale a la porción del volumen de dicha sección ocupada por la fase móvil y la fase estacionaria.

10. Relación de capacidad (k').

$$k' = \frac{Tr_1'}{T_m} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

11. Resolución (R).- Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos.

$$R = \frac{2(Tr_2 - Tr_1)}{W_a + W_b}$$

Un valor de R igual a 1.5 significa separación completa.

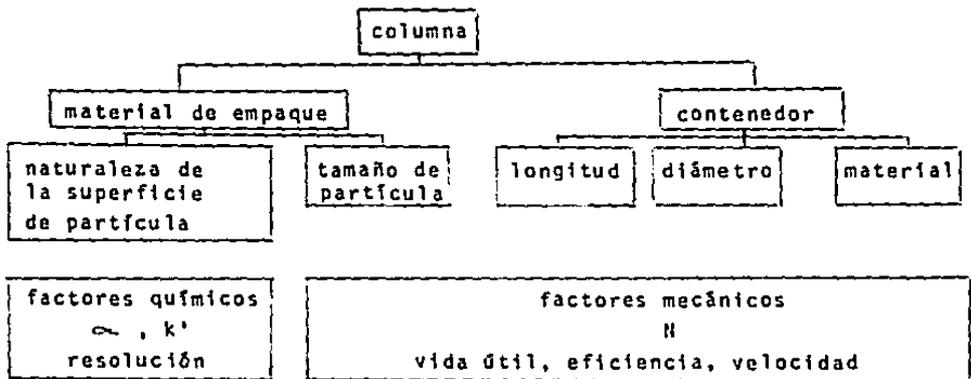
12. Selectividad (α).- En forma práctica se puede decir que α es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

$$\alpha = \frac{Tr_2'}{Tr_1'}$$

Valores elevados de α significa mejores separaciones.

La selección de una "columna" se inicia con el entendimiento que está compuesta de dos partes: el material de empaque y el contenedor (pared de acero inoxidable o de plástico). Como se muestra en la figura, ambos contribuyen al funcionamiento de la columna para la separación de interés.

Los componentes de una columna y su contribución - al funcionamiento cromatográfico: (hoja siguiente)



Los factores químicos, α y k' , son influenciados por la naturaleza de la superficie (fuente de sílica, tamaño de poro, área superficial, fase enlazada, número de carbonos, etc.), y los eluentes que son usados.

La eficiencia es influenciada por el tamaño de partícula y distribución del tamaño de partícula, así como - la manera que queda empacada la columna (lo cual depende del contenedor).

INSTRUMENTAL

El equipo para HPLC deberá ser designado a obtener separaciones de alta eficiencia y datos cuantitativos pre cisos. Así, la combinación de una buena columna y un -- buen instrumento de HPLC nos producirá separaciones de - alta calidad.

En la siguiente tabla se lista el criterio general de necesidades para equipo moderno de HPLC.

| REQUERIMIENTOS DE FUNCIONAMIENTO | CARACTERISTICAS DEL SISTEMA | NECESIDADES DE EQUIPO |
|----------------------------------|---|---|
| Versatilidad | Funcional con diferentes tipos de muestras. Poder realizar las dis-- tintas técnicas cromato-- gráficas y el máximo de operación. | Materiales quími-- camente resistentes. Variedad de detectores. Materiales de empa-- que de alta eficien-- cia. |
| Rapidez | Selectivo, columnas <u>alta</u> mente eficientes. Tratamiento de datos rá-- pido y preciso. | Bombas de alta presión. Manejo automático de datos. |
| Reproducibilidad | control de parámetros - operacionales. | Preciso control de - temperatura y detector. Composición de fase móvil. Velocidad de flujo. Respuesta del detector. |
| Sensibilidad | Alta respuesta del <u>detec</u> tor. | Cuidadosa designación del detector para tener una - buena relación señal/ruido. |

Recipientes de almacenamiento de fase móvil.

Se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes, de una capacidad entre 1 y 3 litros.

La toma del disolvente generalmente se hace a través de un filtro; éste tiene por objeto remover pequeñas partículas que puedan obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna.

Sistemas de bombeo.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (hasta 400 atm).
- Intervalo de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 ml/mn).
- Reproducibilidad y constancia de flujo (aproximadamente 1%).
- Características del flujo (continuo o pulsado).

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.

Se pueden considerar dos tipos de bombas:

- Bombas mecánicas
- Bombas neumáticas

Respecto a las bombas mecánicas, las hay de dos tipos:

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA.**

- Bombas recíprocas (pistón o diafragma)
- Bombas de desplazamiento continuo.

Bombas recíprocas.- La forma como operan es mediante el movimiento de un pistón, y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y cierran; se llena y vacía de modo alternativo, una pequeña cámara. El volumen que envía la bomba en cada pulso se ajusta variando la distancia a que se desplaza el pistón; el flujo total se ajusta variando el número de desplazamientos por unidad de tiempo.

Bombas de desplazamiento continuo.- Llamadas también bombas de embolo o bombas tipo jeringa, son aquellas en que un embolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen; el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el embolo a mayor o menor velocidad.

Bombas neumáticas.- En este sistema de bombeo el líquido se desplaza mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene.

Sea cual sea el tipo de bomba empleado, conviene colocar un filtro entre la bomba y la cámara de inyección para evitar que partículas extrañas bloqueen el sistema; este filtro debe tener la capacidad de retener esas partículas extrañas sin producir una caída de presión excesiva.

Válvulas inyectoras.

Hace relativamente poco tiempo, la introducción de la muestra se efectuaba mediante una jeringa de muy pequeña capacidad con la cual se inyecta la muestra dentro de una cámara donde posteriormente es disuelta y arrastrada por la fase móvil.

Actualmente, se emplean válvulas inyectoras. La muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, desplaza al líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar de acero. La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada-salida se invierte.

Las válvulas inyectoras se fabrican de materiales inertes, como teflón y acero inoxidable.

Entre las características que debe presentar, están:

- Resistir altas presiones
- Tener un volumen pequeño
- Sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil.

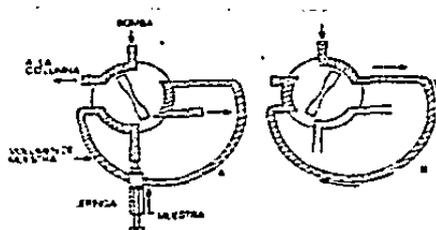


Fig. 4. Válvula inyectora. A. Toma de la muestra. B. Inyección de la muestra.

Programadores de fase móvil.

Esta técnica consiste en cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Por lo general, se utilizan dos disolventes de diferente polaridad.

Las ventajas de esta técnica son: análisis más rápidos, mejores separaciones, mayor simetría en los picos, y mejor detectabilidad.

Sus desventajas son: necesidad de regenerar la columna e incompatibilidad con el detector en ciertos casos.

Registadores.

Su función es representar en un registro gráfico - la señal dada por el detector. Generalmente se utilizan_ registradores potenciométricos de 1 ó 10 mV. Otras características deseables de los registradores son respuesta - rápida de la pluma y velocidad variable de papel.

Controles de temperatura.

La temperatura es un parámetro muy importante en - cromatografía líquida; probablemente tan importante como el caudal o la polaridad de la fase móvil.

En fase inversa, la temperatura influye sobre cuatro magnitudes importantes:

- Solubilidad y tiempo de retención de la muestra.
- Viscosidad de la fase móvil
- Eficacia de la columna.

En general para alcanzar estos objetivos son suficientes temperaturas de 50-70°C.

Generalmente se utilizan baños de agua o de otro líquido, con regulación de temperatura, o bien hornos de tipo eléctrico.

Por otra parte, muchos análisis se llevan a cabo a temperatura ambiente y es por esto que muchos instrumentos carecen de dispositivos de control de temperatura.

Detectores.

Un principal requerimiento en cromatografía líquida moderna es un detector sensitivo para monitorear continuamente el efluente de la columna.

A pesar de todos los avances logrados en las dos últimas décadas, la detección en cromatografía líquida presenta todavía un gran inconveniente. Hasta la fecha no existe ningún detector fidedigno, de uso fácil y que sea sensible a todos los compuestos en cualquier sistema de fases móviles. Por tanto, el usuario de cromatografía líquida debe estar dispuesto a utilizar eventualmente más de un tipo de detector.

Los detectores actualmente en cromatografía líquida poseen un amplio intervalo operativo que normalmente permite trabajar en un mismo aparato a escala analítica o preparativa. Tienen una gran sensibilidad, lo que normalmente permite la detección de picogramos de material. Además, los mejores modelos son muy flexibles, permitiendo una rápida conversión de una fase móvil a otra y de un --

tipo de cromatografía a otro.

Actualmente en los equipos de cromatografía líquida se utilizan principalmente los detectores ópticos. Estos detectores se basan en que se hace pasar una corriente líquida a través de una microcelda de pequeño volumen (aproximadamente 10^{-1}), donde la atraviesa un rayo de luz. Las variaciones en la intensidad de la luz causadas por absorción ultravioleta, emisión de fluorescencia, o cambio en el índice de refracción (según el tipo de detector usado), que resultan de la interacción con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la microcelda, se registra en forma de variaciones de voltaje de salida. Estas variaciones de voltaje se registran gráficamente en un registrador.

Detector UV de longitud de onda fija.

El detector de absorción UV es el más extensamente usado en aplicaciones farmacéuticas. La sensibilidad del detector es suficiente para la mayoría de compuestos y tiene un extenso rango lineal dinámico ($> 10^4$). Ambos criterios son necesarios para obtener análisis cuantitativos exactos.

La mayor parte de los diseños comerciales operan a una longitud de onda de 254 ó 280 nm, utilizando como fuente de luz ultravioleta una lámpara de mercurio de baja presión.

Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. La respuesta de este detector es selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

La única desventaja de este detector es su respuesta selectiva; sin embargo, aun para compuestos que presenten un máximo de absorción a una longitud de onda distinta de 254 a 280 nm, la sensibilidad es buena.

Detector UV-Visible de longitud de onda variable.

En este caso, la longitud de onda es elegida a la cual es más específica la absorción del compuesto a ser analizado.

Estos detectores presentan algunas ventajas con su

similar de longitud de onda fija:

- Es posible seleccionar la longitud de onda óptima para el compuesto.
- Pueden evitarse algunos problemas de la fase móvil (absorción excesiva).
- Algunos diseños permiten obtener el espectro de absorción de cada compuesto por separado.

La mayor desventaja de este tipo de detector es su elevado costo.

En ambos tipos de detectores, la pureza espectroscópica de la fase móvil es muy importante; por lo tanto, se recomienda el empleo de disolventes grado cromatográfico.

Detector de índice de refracción.

El detector de índice de refracción es el detector de uso corriente más universal.

La detección se basa en equilibrar el sistema a caudal constante de fase móvil pura y medir el cambio del índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil; cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil, mayor será el desequilibrio. Por tanto, la máxima sensibilidad se obtendrá cuando existe la máxima diferencia entre la muestra y la fase móvil.

En la actualidad se suelen utilizar dos tipos bási

cos de detectores de índice de refracción. Ambos requieren el uso de una celda de doble paso, en la que el lado que contiene la muestra se compara constantemente con el lado de referencia, que no contiene muestra.

Detector de desviación.

Este detector utiliza el principio de la desviación de la refractometría, midiéndose la desviación de un haz luminoso al variar la composición del lado de la muestra en relación con el lado de referencia, a medida que eluye la muestra a través del aparato. Cuando no hay muestra presente, la luz que pasa a través de ambas partes de la celda se enfoca en el detector. A medida que eluye la muestra varía el ángulo de refracción, moviéndose el haz luminoso. Esto se traduce en un cambio en la señal que va al detector y lo desequilibra. El grado de desequilibrio que se relaciona con la concentración de la muestra, se registra en el registrador.

Detector de reflexión (Fresnel).

El haz luminoso se enfoca tanto a las interfases prisma-líquido de la celda como a una lámina pulimentada que forma la superficie trasera de las celdas de la muestra y de la referencia, reflejándose desde ellas a la foto celda de detección. Al entrar la muestra en una de las celdas la luz se refracta con un ángulo diferente, con lo cual a la salida hacia la foto celda habrá variado su intensidad (no su dirección), y el consiguiente desequilibrio del detector generará un cambio en la energía eléctrica de su señal de salida. Esta diferencia entre la señal de la celda de la muestra y la de la referencia

se transmite a un registrador y está relacionada con la concentración de la muestra.

Detector de fluorescencia.

Los detectores de fluorescencia son los más sensibles y específicos de todos los detectores ópticos.

La detección de fluorescencia es una técnica muy específica, especialmente cuando la longitud de onda de excitación y emisión pueden ser seleccionadas.

La fluorescencia tiene lugar cuando los compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos se excitan con energía de ciertas longitudes de onda (cortas) y emiten radiación de mayores longitudes de onda. Normalmente la emisión se determina en dirección perpendicular a la excitación, y naturalmente la capacidad real de fluorescencia de grupos químicos específicos es función de las longitudes de onda de la excitación y de la emisión.

Relativamente pocas sustancias tienen fluorescencia natural. Sin embargo, es posible inducir esta propiedad por reacciones químicas.

Detectores electroquímicos.

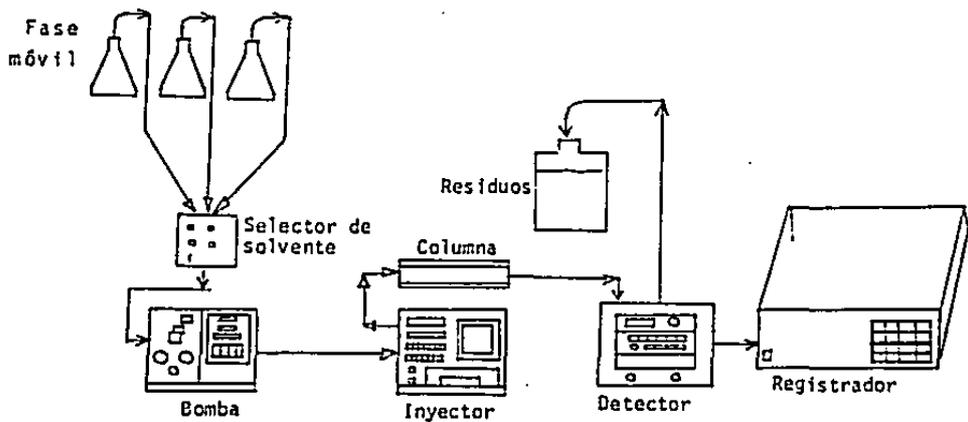
Los métodos electroquímicos tales como polarografía y voltametría han sido recientemente adoptados para requerimientos de detección en HPLC.

Este detector se basa en la oxidación o reducción del compuesto eluido en un electrodo adecuado, midiéndose

la corriente resultante. La detección se basa en el polarógrafo de gota de mercurio, que consta de un par de - - electrodos a los que se aplica un potencial de oxidación o reducción (semifonda) suficiente para crear una corriente de difusión. Puesto que la cantidad de corriente es - una medida directa de la concentración, el proceso es -- cuantitativo.

La detección de los compuestos a los que puede - - aplicarse son algunos de los medicamentos más importantes, compuestos contaminantes y productos naturales.

Este método ofrece, en adición una alta selectividad para estos compuestos, especialmente enfocados a análisis de trazas en matrices biológicas. Por ejemplo, este detector ha sido usado en el análisis de vitaminas, - analgésicos y aminos biogénicas. Estos compuestos pueden ser detectados en muy bajas concentraciones.



Partes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia.

Análisis cualitativo.

La cromatografía líquida es en esencia una técnica de separación y no de identificación, y aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, en general siempre se requiere de alguna técnica no cromatográfica para efectuar la identificación certera de un compuesto determinado.

Hay algunas técnicas y parámetros puramente cromatográficos que, muchas veces, pueden servir de guía o de aproximación a la identificación de un compuesto, pero debe recordarse que no son confiables en un grado absoluto.

El análisis cualitativo (identificación de los picos) se lleva a cabo fundamentalmente con ayuda de los tiempos de retención, comparándolos con los resultados obtenidos al analizar patrones conocidos en idénticas condiciones. Esto no resulta siempre suficiente, pudiendo necesitarse información adicional.

La única manera de identificar una sustancia con un cien por ciento de seguridad es utilizando alguna técnica auxiliar como complemento de la cromatografía líquida, como por ejemplo la espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc. Conviene advertir que en muchos casos se requiere de más de una de estas técnicas para poder identificar la sustancia con certeza.

Análisis cuantitativo.

El objetivo de la mayoría de los ensayos es determinar la cantidad de los varios componentes presentes en una muestra.

En HPLC el uso de las áreas de los picos para las mediciones cuantitativas se basa en el hecho de que la concentración de un componente de la muestra es directamente proporcional a su área.

Entre los métodos de cuantificación usados actualmente, se cuentan:

Calibración externa.

Consiste en comparar el área correspondiente a cantidades conocidas de la sustancia problema con el área obtenida para la misma sustancia en la mezcla y cuya concentración se desea determinar.

Las desventajas de este método son: Debe conocerse la cantidad de muestra inyectada y la calibración requiere algún tiempo. También para poder comparar los resultados con la gráfica de calibración, la sensibilidad del detector debe mantenerse constante a lo largo de todos los experimentos y de día a día.

Patrón interno.

Consiste en comparar la relación entre áreas obtenidas del compuesto problema y del patrón interno con diversas concentraciones del compuesto problema. Después,

a la muestra problema se le agrega la misma cantidad conocida de la substancia que sirvió de patrón interno y se determina su relación de áreas (muestra/patrón). Se efectúa así la lectura de la composición de la muestra en la gráfica de calibración, puesto que se conoce la cantidad de muestra patrón.

Este método no requiere inyectar volúmenes de muestra con mucha precisión; además muchos errores, por ejemplo, recuperación de la muestra y variaciones instrumentales, se ven compensados porque tanto el compuesto problema como el patrón interno se analizan en las mismas condiciones.

La substancia que se utiliza como patrón interno - debe tener ciertas características:

- Debe tener una similitud estructural con la substancia que se determina.
- Debe tener una concentración aproximada a la de la substancia que se determina.
- Tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema pero sin interferir con él.
- Ser inerte.
- No formar parte de la muestra.

SISTEMA ADMINISTRADOR DE DROGA EN FORMA DE LIBERACION CONTROLADA PARA FORMAS DE DOSIFICACION SOLIDAS ORALES. (11, 12, 13, 14, 15)

El objetivo de todo sistema de suministro de droga es alcanzar una concentración constante de droga en el sitio de acción, que sea terapéuticamente efectiva, no tóxica y, generalmente que actúe durante un cierto tiempo.

El concepto de liberación sostenida implica sistemas administradores de droga que son designados a alcanzar un efecto terapéutico prolongado por liberación continua del medicamento en un período de tiempo extendido, - después de la administración de una sola dosis. En el caso de formas de administración oral, el período de tiempo está relacionado a horas y depende críticamente del tiempo de residencia de la forma farmacéutica en el trato gastrointestinal.

Durante los últimos 20-30 años un número importante de sustancias han sido introducidas en el creciente mercado de sistemas administradores de droga en forma de liberación controlada.

La mayoría de los estudios y desarrollo en esta área se ha centrado en formas de administración para uso oral, aunque se está incrementando la atención a otras rutas de administración como son dérmica, oftálmica, intravertebra, intramuscular, etc.

Los productos de liberación sostenida aparecen como una nueva clase de formas de dosificación farmacéutica durante principios de 1950. El producto fue desarrollado

a modificar y mejorar el funcionamiento de la droga, incrementando el tiempo de acción y reduciendo la frecuencia de administración.

Los beneficios y limitaciones que presentan los sistemas administradores de droga en forma de liberación controlada para formas sólidas orales, se pueden puntualizar en las siguientes:

Beneficios:

- 1.- Prolongación de acción de la droga.
- 2.- Reducción de efectos colaterales.
- 3.- Reducción de frecuencia de administración.
- 4.- Mejor complacencia del paciente.
- 5.- La oscilación de los niveles sanguíneos característicos de múltiples dosificaciones de formas de administración convencionales es reducida, a causa de que se mantiene un nivel sanguíneo constante.
- 6.- Se obtiene menos potenciación o reducción de la actividad de la droga durante su uso prolongado.
- 7.- Se reduce a un mínimo la acumulación de droga en los tratamientos prolongados.
- 8.- Economía.

Limitaciones:

- 1.- La administración de medicamentos de liberación controlada no permite la pronta terminación de la terapia.
- 2.- Se tiene menos flexibilidad al ajustar regímenes de dosificación.

- 3.- En el caso de envenenamiento accidental, la administración de un antídoto es difícil.
- 4.- Las siguientes características deberán de tomarse en cuenta en una droga y tratar de evitar su formulación en una forma de liberación controlada:
- Drogas con vida media biológica corta (< 1 hr).
 - Drogas con vida media biológica grande (> 12 hr.).
 - Sin son requeridas grandes dosis (> 1 gr.).
 - Drogas con bajos índices terapéuticos.

Clasificación.

Desafortunadamente, el término liberación sostenida ha sido usado bastante, y algunos productos marcados como formas de liberación sostenida pueden no ser liberación sostenida en el exacto sentido del término. Parte de la razón a esta situación es que los productos son usualmente designados por términos que no están basados en la tecnología usada en su formulación o fabricación o en sus características de funcionamiento. Es así que una desconcertante colección de nombres y términos han sido usados para describir formas de liberación sostenida.

La siguiente tabla lista algunos de los términos que han sido usados como sinónimos en años recientes:

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| Acción continua | liberación constante |
| Acción controlada | Liberación continua |
| Absorción retardada | Liberación controlada |
| Acción retardada | Liberación retardada |
| Acción extendida | Liberación extendida |
| Acción prolongada | Liberación gradual |
| Acción repetida | Liberación programada |
| Acción lenta | Liberación prolongada |
| Acción sostenida | Liberación lenta |
| Depósito de liberación sostenida | Liberación espaciada |
| Desintegración tardía | Liberación sostenida |
| Depósito | Liberación tardía |

Una cuidadosa examinación de los términos listados_ en la tabla indica que ellos no necesariamente sugieren - características similares. Algunos términos se refieren_ a la duración de liberación o acción de la droga; algunos sugieren la velocidad de liberación de la droga; algunos_ aluden a la frecuencia de liberación de la droga.

Generalmente, los términos de la tabla pueden ser categorizados en cuatro grupos principales:

- 1.- Liberación retardada.
- 2.- Liberación sostenida.
- 3.- Acción repetida.
- 4.- Liberación controlada.

1) Liberación retardada.- Este término significa_ que la droga no es destinada a ser liberada de su sistema administrador inmediatamente después de su administración, sino a un tiempo posterior. Son ejemplos de este tipo, - los productos con cubierta entérica, los cuales retardan_ la liberación de la droga hasta que la forma de dosifica- ción alcanza el tracto gastrointestinal; son usados prin- cipalmente a prevenir efectos colaterales asociados con la liberación de la droga en el estómago o a proteger la droga de degradación en el ambiente de ácido gástrico.

2) Liberación sostenida.- Una formulación de libe- ración sostenida está designada a liberar rápidamente al- guna predeterminada fracción de la dosis total para la - respuesta terapéutica normal, y luego a mantener esta res- puesta terapéutica por un período de tiempo.

Los productos de liberación sostenida están desig- nados principalmente a disminuir la frecuencia de adminis_

tracción.

3) Acción repetida.- Una forma de dosificación de acción repetida inicialmente libera el equivalente de una única dosis convencional de la droga y posteriormente - otra dosis de la droga a un tiempo posterior. Algunas - formas son capaces de liberar una tercera dosis de la droga después de la segunda dosis.

4) Liberación controlada.- Recientemente los tér-
minos liberación controlada y liberación sostenida se han
usado como sinónimos; la distinción está en que mientras_
la liberación de droga del sistema de liberación sosteni-
da está basado en mecanismos que son sensitivos a las con-
diciones del medio ambiente a las cuales son expuestos -
(pH, motilidad, y otras variables a través del tracto gas-
trointestinal), la velocidad de liberación de sistemas de
liberación controlada es determinada por el sistema en -
sí. Así, el término liberación controlada incluye no sólo
la noción de duración prolongada como lo implica el -
término liberación sostenida, sino también denota predic-
tabilidad y reproducibilidad de cinéticas de liberación -
sobre un período de tiempo especificado.

Los métodos de fabricación pueden agruparse en al-
gunos procedimientos tipo, de acuerdo a los principios -
físicoquímicos en los cuales se basa la liberación del -
medicamento desde la forma farmacéutica.

1.- Recubrimientos de tipo entérico.

Estos sistemas se han diseñado con el objeto de -
evitar la descomposición de medicamento alterables en el
medio ácido del estómago o para impedir su acción irritante

te sobre la mucosa gástrica. Con la aplicación del recubrimiento entérico se logra que una forma farmacéutica - pueda pasar inalterada a través del estómago y desintegrarse y posteriormente disolverse en el intestino delgado, produciendo la liberación del medicamento.

Este mismo principio puede emplearse para entregar el medicamento de manera programada, con el objeto de prolongar su efecto. Mediante el empleo de este procedimiento, se logra que el principio activo se libere, en una - parte, inmediatamente, cuando la forma farmacéutica llega al estómago y una segunda porción de ella se entregue en el intestino, luego de disolverse la cubierta entérica.

Estos productos se fabrican en la forma convencional de manufactura de comprimidos y de grageas. El núcleo consiste en un comprimido corriente, la droga contenida en el núcleo, corresponde a la segunda fracción del - medicamento. Una vez obtenido el comprimido, se recubre primero con una cubierta entérica que protege al núcleo - de la acción gástrica y luego, sobre esta cubierta entérica, se adiciona un recubrimiento azucarado, que contiene la dosis inicial del medicamento.

2.- Gránulos recubiertos.

Este tipo de preparados está constituido por una - mezcla de corpúsculos o "pellets". La dosis inicial es - entregada por corpúsculos sin recubrir y la de mantención es proporcionada por corpúsculos con distintos grados de recubrimiento. Estos corpúsculos son colocados en cápsulas de gelatina rígida y de esta manera son empleados.

Los corpúsculos o "pellets" se preparan por recubrimiento de núcleos que contienen el medicamento. Estos núcleos tienen un tamaño aproximado a malla 12 a 60.

Una forma de obtener los núcleos que sirven de base para la preparación de los "pellets", consiste en utilizar pequeños gránulos de azúcar o de otras sustancias inertes y recubrirlos con soluciones adhesivas tales como soluciones de gelatina, polivinil-pirrolidona, derivados de celulosa y otras sustancias de este tipo, que contienen disuelto el medicamento que se va a incorporar. Las partículas así obtenidas se someten después a procesos que retardan la liberación del medicamento.

Las sustancias que se emplean para recubrir pueden ser de tipo graso: cera carnauba, cera de abeja, monoestearato de glicerilo, ácidos grasos, alcoholes grasos, etc.

Para efectuar los recubrimientos con sustancias grasas se utilizan soluciones en solventes orgánicos, como tetracloruro de carbono, cloroformo o alcohol.

La cesión del medicamento desde formas farmacéuticas que contienen corpúsculos recubiertos con sustancias grasas, es independiente del pH, produciéndose por un proceso de difusión. En la liberación tiene especial importancia la permeabilidad de la película lipídica al vapor de agua, y puede considerarse como uno de los factores que controla la cesión del medicamento. La naturaleza de la cubierta, el grosor de ella y las características fisicoquímicas de la droga tienen influencia en la velocidad a que se produce la penetración del agua en el pellet.

3.- Formación de complejos o sales poco solubles.

En este tipo de sistemas se trata de formar compuestos insolubles o muy poco solubles en agua, que tengan la propiedad de liberar en forma lenta el medicamento en el tubo gastrointestinal.

El más conocido de estos procedimientos es la formación de tanatos de algunos medicamentos que son bases orgánicas.

Este procedimiento puede ser aplicado a fármacos que tengan grupos amino, y que formen compuestos insolubles con el ácido tánico.

Una vez obtenido el complejo droga-ácido tánico al estado de polvo, éste puede emplearse en cualquier tipo de forma farmacéutica, ya sea comprimido o cápsula.

En el tubo gastrointestinal, el complejo reacciona con los electrolitos disueltos en el medio y cede, paulatinamente, el principio activo dejándolo en condiciones de ser absorbido.

Se ha demostrado que la presencia de electrolitos y un pH básico producen un aumento en la velocidad de cesión de la amina desde el complejo droga-ácido tánico.

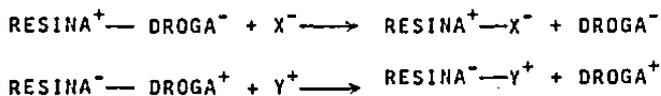
4.- Empleo de resinas de intercambio iónico.

Las resinas de intercambio iónico son unos polímeros con enlaces cruzados insolubles en agua que contienen grupos formadores de sales en posiciones repetidas de la

cadena del polímero. La droga se fija a la resina mediante exposición repetida de la resina con la droga.

La liberación de droga a partir del complejo droga-resina depende del medio iónico, es decir, del pH y la concentración de electrolitos, dentro del tracto gastrointestinal, así como de las propiedades de la resina.

Las moléculas de droga fijadas a la resina se liberan mediante el intercambio de iones debidamente cargados en el tracto gastrointestinal como se ve en la figura, - seguido por difusión de la molécula de droga desde la resina.



La mayoría de las resinas de intercambio iónico - que se emplean en la actualidad en productos de liberación sostenida, contienen grupos de ácido sulfónico que intercambian drogas catiónicas como las que tienen la función amina.

Se han resumido algunas ventajas de este proceso - en los siguientes puntos:

- Las resinas no son tóxicas y se excretan sin dificultad por el tubo digestivo.
- La manufactura de la forma farmacéutica es muy simple, ya que, una vez obtenido el complejo de la resina, en la preparación de cápsulas, comprimidos, etc., se utilizan los excipientes y técnicas comunes para estas formas farmacéuticas.

- Cuando se emplean resinas de intercambio iónico apropiadas para el medicamento que se formula, la velocidad de cesión depende fundamentalmente de la fuerza iónica del medio.
- La cesión del medicamento desde la resina de intercambio iónico puede controlarse por medios relativamente simples, por ejemplo, variando el tamaño de partícula o el grado de entrecruzamiento de la resina.

5.- Erosión lenta.

Los preparados de acción sostenida que se basan en este principio, contienen la droga mezclada con algunas sustancias grasas no absorbibles en el tubo gastrointestinal. De esta mezcla, la droga se va cediendo paulatinamente, a medida que los líquidos del tubo gastrointestinal van erosionando poco a poco el comprimido.

Entre las sustancias grasas utilizadas están: - ácidos grasos, alcoholes grasos, algunas ceras sólidas de alto peso molecular y de punto de fusión elevado.

6.- Utilización de gomas y coloides hidrofílicos.

Estos métodos utilizan una mezcla del principio activo con algunas gomas u otras sustancias coloidales hidrofílicas, no digestibles.

Cuando estos comprimidos se ponen en contacto con el agua o los líquidos digestivos, ocurre una rápida cesión al producirse la disolución del medicamento que se encuentra en las partes de la superficie que se ponen en

inmediato contacto con el líquido. Sin embargo, luego de transcurrido un cierto tiempo, por hidratación y gelación de la goma o del hidrocoloide, se forma una barrera de alta viscosidad en la interfase líquido-comprimido, que hace que la liberación del medicamento se efectúe lentamente.

Las sustancias que se emplean en este tipo de preparados son: goma arábiga, alginatos, derivados de celulosa, etc.

La cesión del principio activo desde el comprimido es influenciada por la naturaleza, las características y la proporción de la goma o sustancia coloidal empleada y también por la presencia de electrolitos y la dureza del comprimido.

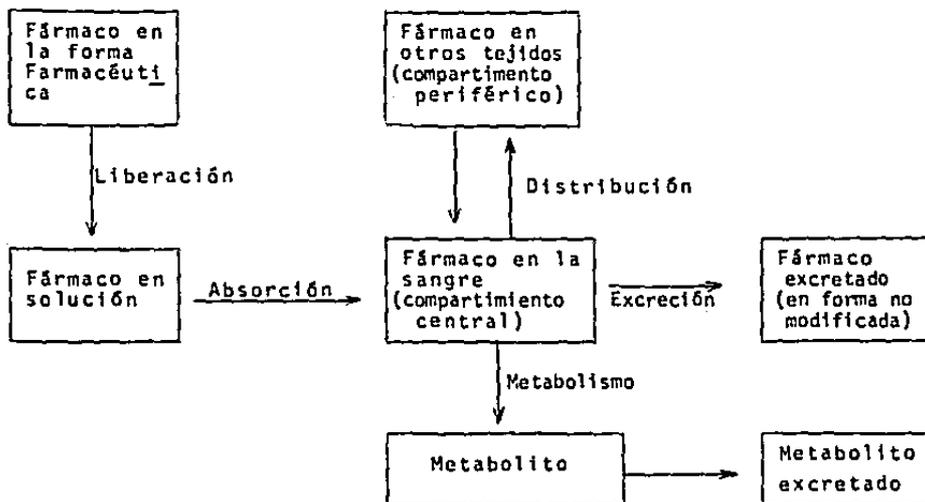
7.- Comprimidos de matriz plástica.

Los preparados de este tipo están formados por comprimidos fabricados con algún tipo de sustancia plástica que tiene incluido en su interior el principio activo. De esta manera, se forma una especie de matriz plástica, que en su paso por el tracto gastrointestinal libera el medicamento en forma lenta, cediéndolo en forma gradual al medio líquido y dejándolo en esta forma en condiciones para la absorción. El comprimido mantiene su estructura durante el trayecto, excretándose como tal.

En la fabricación de estos comprimidos se emplean diversos tipos de polímeros, que le dan además una estructura rígida. Los polímeros deben ser fisiológicamente inertes. Se han empleado copolímeros metacrilato-metilmetacrilato, cloruro de polivinilo, etc.

En el comprimido se incluyen, además del polímero_ y los principios activos, coadyuvantes especiales, denominados acanalantes o canalizadores, que son sustancias_ muy solubles en agua que, al disolverse, aumentan la porosidad de la matriz, permitiendo el ingreso de los líquidos que realizan la extracción del medicamento - desde el interior de ella.

El destino o curso que sigue un fármaco en el organismo, una vez que se ha administrado, puede apreciarse - en el esquema simplificado representado en la siguiente figura:



En este esquema puede observarse que, desde el sitio de aplicación, lugar donde el medicamento se administra, éste ingresa a la sangre por un proceso de absorción. Las condiciones del proceso de absorción, especialmente - la velocidad, dependen en forma importante del ambiente - o características fisicoquímicas del sitio de absorción y de las propiedades fisicoquímicas del medicamento.

La absorción de los medicamentos se efectúa, en su gran mayoría, por un proceso de transporte activo - y simple difusión.

La absorción gastrointestinal puede producirse a lo largo de todo el tubo gastrointestinal, incluyendo el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. Sin embargo, hay variaciones notables en la absorción que se producen en las distintas partes del tubo gastroentérico. El intestino delgado, tiene características fisiológicas especialmente apropiadas para la absorción y, en general, los medicamentos se absorben en esta zona en mayor cantidad y en forma más rápida.

Las propiedades físicoquímicas de los fármacos son de gran importancia en el proceso de absorción. Cuando se trata de fármacos que son ácidos o bases débiles, la absorción es influida en formas notable por la relación existente entre el pKa de la droga y el pH del medio.

El pH del medio también puede influir en la solubilidad del medicamento que se administra.

La absorción en el tubo gastrointestinal depende de la velocidad de disolución del medicamento y, por lo tanto, de los diversos factores que la afectan.

Una vez que el medicamento ingresa al torrente sanguíneo, se distribuye en el organismo a otros compartimentos o fluidos de distribución, por proceso de difusión, alcanzando rápidamente un estado de equilibrio. Por esta razón, la concentración de medicamento en la sangre, refleja o está relacionada con la concentración en los otros tejidos y en el sitio de acción del mismo.

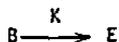
En forma casi simultánea con la distribución, comienzan a producirse en el organismo los procesos de metabo

lismo y de excreción.

La biotransformación o metabolismo de los medicamentos se verifica esencialmente en el hígado; sin embargo, también puede producirse en otros compartimentos o tejidos.

El fármaco, en forma inalterada o sus metabolitos, se excretan principalmente por vía urinaria. Existen, -- por cierto, otras vías de excreción del medicamento, como por ejemplo, la respiratoria y la cutánea; sin embargo, -- la renal es la de mayor importancia para la mayoría de -- los medicamentos.

Si se considera el organismo como un solo compartimiento abierto, la eliminación de medicamento puede representarse por el siguiente modelo:



En este modelo, B representa el organismo, E la eliminación y K la constante de eliminación. E, incluye todos los procesos que eliminan medicamento del organismo. De la misma manera, la constante K, corresponde a la suma de todas las constantes de los procesos involucrados en la eliminación.

La variación de la cantidad de medicamento en el organismo a través del tiempo, queda descrita por la siguiente expresión:

$$\frac{dB}{dt} = -KB$$

y la cantidad de medicamento en el organismo en cualquier tiempo queda representado por la ecuación:

$$B = B_0 e^{-Kt}$$

Para expresar la variación de medicamento respecto del tiempo, en términos de la concentración sanguínea, C, es necesario dividir por el volumen de distribución, Vd, que es la relación existente entre la cantidad total de medicamento en el organismo y la concentración en la sangre:

$$Vd = \frac{B}{C}$$

de manera que:

$$C = C_0 e^{-Kt}$$

en la que C es la concentración de medicamento en la sangre a un tiempo dado t, C_0 es la concentración inicial y K es la constante de eliminación. Expresando esta ecuación en forma logarítmica se tendrá:

$$\log C = \log C_0 - \frac{K}{2.303} t$$

El proceso de eliminación de fármaco desde el organismo, se expresa casi siempre, en términos de la constante de eliminación K y de la vida media biológica, $t_{1/2}$. La vida media biológica de un medicamento es el tiempo necesario para que el fármaco disminuya a la mitad, en un proceso de eliminación exponencial desde el organismo. - De manera que:

$$K = \frac{0.693}{t_{1/2}}$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

La vida media se expresa en términos de tiempo, generalmente horas o minutos y K tiene la dimensión de tiempo^{-1} .

La vida media biológica es una característica de cada medicamento. Los fármacos que tienen vida media biológica muy extensa, tienen por sí mismos acción prolongada y no se requiere incluirlos en formulaciones especiales.

El objetivo que se persigue con una formulación - de acción prolongada es lograr en forma rápida un nivel - terapéuticamente efectivo del medicamento, y luego, produ- cir una entrega a la misma velocidad a que el fármaco se elimina del organismo, de manera de mantener constante la concentración en la sangre. La introducción de medicamen- to al organismo a una velocidad constante y su elimina- ción, pueden representarse por el siguiente modelo:



en la que k_0 corresponde a la constante de introducción, - B a la cantidad de medicamento en el organismo, E repre- senta el proceso de eliminación y K la constante de elimi- nación.

En este modelo, la variación de medicamento en B - queda expresada en la siguiente ecuación:

$$\frac{dB}{dt} = k_0 - KB$$

Para que la cantidad de droga en B se mantenga - constante y el nivel sanguíneo sin variaciones, es neces- sario que la introducción de medicamento se efectúe a una velocidad igual a la de eliminación, de manera que:

$$\frac{dB}{dt} = k_0 - KB = 0$$

La absorción de medicamento, que se produce por - difusión, puede expresarse por la ecuación:

$$\frac{dA}{dt} = -kaA$$

en la que k_a es la constante de absorción y A , la cantidad de medicamento en el sitio de absorción. De manera que, para que la introducción de medicamento en el organismo sea constante, es necesario que la cantidad de medicamento en A , permanezca invariable. Por lo tanto, la liberación de medicamento desde la forma farmacéutica, deberá producirse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$KA = k_0 = KB$$

En estas circunstancias, la cantidad de medicamento en el organismo y consecuentemente la concentración o nivel sanguíneo, permanecerán constantes.

Las formas farmacéuticas de acción controlada, se diseñan de manera que entreguen, en un tiempo corto, la cantidad de medicamento necesaria para alcanzar el nivel terapéuticamente efectivo y que después, lo liberen a una velocidad apropiada para que permanezca constante. A la porción de medicamento que se libera de inmediato, se le denomina "dosis inicial", designándola como D_0 . A la fracción de entrega lenta se le denomina "dosis de mantención" y se le designa D_m .

La dosis inicial D_0 será la cantidad de medicamento necesaria para producir el nivel sanguíneo terapéuticamente efectivo.

Si B es la cantidad de medicamento en el organismo, necesaria para mantener el nivel sanguíneo requerido, la dosis de mantención, D_m estará dada por la ecuación:

$$D_m = BKh$$

donde h es el tiempo que se desea mantener el nivel terapéutico del fármaco.

El diseño de la formulación de los preparados de acción sostenida de uso oral, y el cálculo de la dosis inicial y de mantención, se realiza de acuerdo a un esquema en que la forma farmacéutica debe liberar inmediatamente la cantidad de medicamento que produzca el nivel terapéutico y una vez alcanzado éste, se entregue el fármaco que mantiene dicho nivel durante 10 a 12 hrs. Sin embargo, en muchos casos, la liberación de medicamento no se efectúa de acuerdo a este plan, ya que, en algunas circunstancias, la cesión de medicamento desde la porción de acción sostenida de la forma farmacéutica, se comienza a producir de modo simultáneo a la liberación de la dosis de inicio.

Sin embargo, estas consideraciones tienen sólo un interés teórico, ya que, desde un punto de vista práctico, las variaciones individuales -que pueden producirse al utilizar en los cálculos de las dosis, los valores promedio de la constante de eliminación- son, en general, de mayor magnitud que las que se pretende corregir.

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ESTUDIOS DE DISOLUCION.

El estudio y establecimiento de métodos de disolución "in vitro", obedece a la necesidad de disponer de - modelos experimentales que reflejen lo más fidedignamente posible las condiciones "in vivo", especialmente aquellas que puedan afectar la velocidad de disolución y, por lo - tanto, la biodisponibilidad de los medicamentos en el organismo.

Además de los controles de la cantidad de principio activo, características externas y propiedades físicas generales de la forma farmacéutica, y de la estabilidad del producto, un preparado de liberación controlada - debe ser evaluado en forma cuidadosa en la liberación del principio activo que contiene, en relación con el tiempo.

La necesidad de contar con métodos precisos y re- producibles ha estimulado la creación de modelos "in vi- tro" que permitan su aplicación en los laboratorios de - control de calidad en las industrias elaboradoras de medi- camentos. Estos métodos han sido adoptados por textos - oficiales en un intento por unificar los métodos existentes, satisfacer la necesidad de aplicar un control eficaz basado en las características de disolución de las diversas formulaciones sólidas y determinar los límites pertinentes.

Se ha tratado de reproducir "in vitro", en la for- ma más aproximada posible, a las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal, tratando de producir o simular las particularidades y características del proceso de absorción de medicamentos. La reproducción de estas condiciones "in vitro" resulta bastante compleja, puesto que

son numerosos los factores que influyen en la liberación del medicamento en el tracto gastrointestinal y en su posterior absorción.

Los controles "in vitro" deben considerarse como procedimientos que permiten conocer la cantidad de fármaco cedida por la preparación en la unidad de tiempo en las condiciones experimentales que se han establecido.

Medio de disolución.- Si se considera que la desintegración de un comprimido o cápsula se realiza preferentemente en el estómago y posteriormente la disolución y absorción del principio activo se va realizando a medida que la substancia va avanzando a través del tracto gastrointestinal. Conforme a esto, los medios de disolución empleados son diferentes, referente a su pH, en función del tiempo.

In vitro, la elaboración de estos medios de disolución, generalmente es a través de soluciones buffer de diferentes sales.

De esta forma se trata de simular el cambio paulatino de pH que experimenta el medio que atraviesa la forma farmacéutica en su trayectoria por el tracto gastrointestinal.

El volumen de líquido de disolución a emplear depende, en gran parte de la solubilidad del principio activo en el medio de disolución.

Temperatura.- La temperatura empleada en estos ensayos es de 37°C, la cual, por afectar de manera marca-

da la solubilidad de los fármacos, debe ser mantenida dentro de límites de variación muy estrechos mediante el uso de termostatos adecuados.

Recipiente de disolución.- La elección del recipiente donde se efectúa la disolución es, en cierta medida, de fundamental importancia. El tamaño puede variar desde algunos mililitros hasta varios litros, según el método usado. El recipiente puede ser un vaso, un frasco o una celda de diálisis de pequeña capacidad de líquido.

Se ha conferido gran importancia a la forma del recipiente de disolución, ya que se han detectado diferencias apreciables según sea su forma. Por este motivo, se ha propuesto el empleo de frascos de fondo redondo, en los cuales el comprimido o cápsula o bien el producto de su desintegración quedará siempre en posición central.

Sistema de agitación.- Este factor, de gran importancia en estudios de cinética de disolución de medicamentos, puede adoptar diferentes modalidades. La más empleada, por su sencillez, consiste en introducir una varilla agitadora provista de paletas y conectada con un motor que le imprime una velocidad de agitación regular y adecuada mientras dura el estudio.

En otros sistemas de agitación, se colocan los recipientes de disolución de tal manera que roten sobre un eje a una velocidad aproximada de 30 r.p.m.

Los procedimientos consisten, en general, en mantener la forma farmacéutica durante un tiempo determinado -

en un medio líquido con características especiales de pH. El producto se mantiene en movimiento, mediante la introducción de un sistema apropiado de agitación, y a una temperatura igual a la del organismo. Durante el transcurso del estudio se toman muestras a intervalos convenientes de tiempo, para efectuar una evaluación de la velocidad de liberación del principio activo desde la forma farmacéutica.

La valoración del fármaco cedido al medio líquido, a los diferentes intervalos de tiempo, puede efectuarse sobre el residuo remanente en la forma farmacéutica a dichos intervalos, obteniéndose la cantidad de fármaco liberado por diferencia; o bien, valorando el medicamento directamente en el medio de disolución a los tiempos señalados.

3.-

PARTE EXPERIMENTAL.

Las formulaciones sobre las cuales se realizó el desarrollo analítico son las siguientes:

- Producto terminado: cápsulas

| | |
|---|-----------|
| Maleato de Carbinoxamina | 8 mg. |
| Clorhidrato de Fenilefrina | 5 mg. |
| Clorhidrato de Fenilpropanolamina | 50 mg. |
| c.b.p. | 1 cápsula |

- Proceso

Al tener las microesferas en granel con sus tiempos de liberación dentro de especificaciones, se determina como:

mg. de Maleato de Carbinoxamina/ gr. de microesfera.

1. REACTIVOS

- 1.1. Carbinoxamina maleato, substancia de referencia (secado a 105°C por 2 horas).
- 1.2. Feniramina maleato, substancia de referencia - (secado a 65°C por 6 horas).
- 1.3. Metanol Grado CLAR.
- 1.4. Acetonitrilo Grado CLAR.
- 1.5. Acetato de sodio trihidratado.
- 1.6. Acido acético glacial R.A.
- 1.7. Agua destilada.

2. MATERIAL Y EQUIPO

- 2.1. Matraces volumétricos de 25 y 50 ml.
- 2.2. Pipetas volumétricas de 4 ml.
- 2.3. Papel filtro Whatmann No. 42 o equivalente.
- 2.4. Baño de ultrasonido.
- 2.5. Membrana Millipore tipo FHUO 04700, de 0.5 cm. - de tamaño de poro, para filtración de solventes orgánicos.
- 2.6. Membrana Millipore tipo HAWP 04700, de 0.45 cm. de tamaño de poro, para filtración de soluciones acuosas.
- 2.7. Cromatógrafo de líquidos Waters equipado con:
 - 2.7.1. Inyector Automático WISP, modelo 712.
 - 2.7.2. Módulo de Compresión Radial.
 - 2.7.3. Detector de Absorbancia Ultravioleta, de longitud de Onda fija, modelo 440.
 - 2.7.4. Módulo Integrador de Datos, modelo 730.

3. PREPARACION DE SOLUCIONES

3.1. SOLUCION 20% DE ACETATO DE SODIO pH 5.5. (1→10)

Pesar exactamente 20 gr. de Acetato de sodio trihidratado y transferirlo a un vaso de precipitados de 100 - ml., añadir 80 ml. de agua destilada y disolver. Ajustar esta solución a pH 5.5 con Acido acético glacial; a continuación llevar a volumen de 100 ml. con agua destilada.

Diluir esta solución 1 → 10 con agua destilada.

3.2. SOLUCION DE REFERENCIA INTERNA

Pesar exactamente 100 mg. de Feniramina maleato, - sustancia de referencia, y transferirlo a un matraz volumétrico de 25 ml. Añadir 10 ml. de solución 0.01N de Acido clorhídrico, disolver, llevar a volumen con solución 0.01N de Acido clorhídrico. Homogenizar perfectamente. Concentración de 4 mg/ml.

3.3. SOLUCION DE REFERENCIA

Pesar exactamente 100 mg. de Carbinoxamina maleato, sustancia de referencia, y transferirlo a un matraz volumétrico de 25 ml. Añadir 10 ml. de solución 0.01N de Acido clorhídrico, disolver, llevar a volumen con solución 0.01N de Acido clorhídrico. Homogenizar perfectamente. Concentración de 4 mg/ml.

3.4. SOLUCION FACTOR RESPUESTA

Transferir 4 ml. de solución de referencia interna

y 4 ml. de solución de referencia a un matraz volumétrico de 50 ml., llevar a volumen con solución 0.01N de Acido clorhídrico. Homogenizar perfectamente. Concentración de 0.32 mg/ml.

3.5. SOLUCION PROBLEMA-PRODUCTO TERMINADO

Determinar el peso promedio del contenido de 20 cápsulas. Pulverizar una porción de 10 gr. del contenido de las cápsulas, pasar el polvo a través de tamiz malla No. 40.

Pesar una cantidad de polvo equivalente a 16 mg. de Carbinoxamina maleato (aproximadamente 820 mg. de polvo), transferir a un matraz volumétrico de 50 ml., añadir 30 ml. de solución 0.01N de Acido clorhídrico, añadir 4 ml. de solución de referencia interna. Llevar las muestras a baño de ultrasonido con calor (45-55°C) por 15 mn., con agitación ocasional.

Enfriar, llevar a volumen con solución 0.01N de Acido clorhídrico. Homogenizar perfectamente.

Filtrar las soluciones a través de papel filtro Whatmann No. 42 o equivalente.

3.6. SOLUCION PROBLEMA-PROCESO

Tomar una muestra representativa de microesfera en granel de Carbinoxamina maleato, previamente pasadas a través de tamiz malla No. 12. Pulverizar las microesferas y pasar el polvo a través de tamiz malla No. 40.

Pesar una cantidad de polvo equivalente a 16 mg. -

de Carbinoxamina maleato (aproximadamente 160 mg. de polvo), transferir a un matraz volumétrico de 50 ml., añadir 30 ml. de Acido clorhídrico 0.01N, añadir 4 ml. de solución de referencia interna.

Llevar las muestras a baño de ultrasonido con calor (45-55°C) por 15 mn. con agitación ocasional.

Enfriar, llevar a volumen con Acido clorhídrico - 0.01N, homogenizar perfectamente. Filtrar las soluciones a través de papel filtro Whatmann No. 42 o equivalente.

4. PARAMETROS INSTRUMENTALES

4.1. CONDICIONES.

- 4.1.1. Fase móvil: Metanol: Solución 20% de Acetato de sodio pH 5.5 (1 → 10): Acetonitrilo (45:45:10).
- 4.1.2. Velocidad de flujo: 1.5 ml/mn.
- 4.1.3. Columna: Cartucho radial μ -Bondapak C₁₈, de 10 cm. de longitud por 8 mm. de diámetro interno.
- 4.1.4. Detector: 254 nm UV, 0.1 U.A.
- 4.1.5. Presión: Aproximadamente 500 psi
- 4.1.6. Velocidad de carta: 0.25 cm/mn.
- 4.1.7. Volumen de inyección: 15 μ l.
- 4.1.8. Tiempo de corrida: 11 min.

4.2. TIEMPOS DE RETENCION.

Las condiciones citadas arriba son "para referencia solamente" y pueden ser variadas (a causa de las diferentes eficiencias de las columnas) para obtener los siguientes tiempos de retención aproximados:

Maleato de Carbinoxamina: 8.0 min.

Maleato de Feniramina (estándar interno): 5.5 min.

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Equilibrar el equipo a las condiciones de trabajo, hasta tener una línea base estable.
- 5.2. Inyectar 15 microlitros de la solución estándar y de la solución problema en el Cromatógrafo - de Líquidos de Alta Resolución.
- 5.3. Una vez terminado el análisis, lavar la bomba y columna primero con 100 ml. de agua destilada - (filtrada y degasificada), y después con 100 - ml. de una solución Metanol:Agua (50:50) (fil--trada y degasificada).

6. ANÁLISIS CUANTITATIVO.

Para realizar el análisis cuantitativo se llevó a cabo por el método de "adición de estándar interno", ya que este método es menos susceptible a errores técnicos y compensa, en algunos casos errores producidos durante la preparación de la muestra.

7. CÁLCULOS

Use el porcentaje de área obtenido del promedio de dos inyecciones de la solución factor respuesta para el cálculo de Factor Respuesta.

Use el porcentaje de área obtenido del promedio de dos inyecciones de la solución problema para el cálculo del contenido.

7.1. FACTOR RESPUESTA

$$\begin{array}{l} \text{(Fr) Carbinoxamina} \\ \text{maleato} \end{array} = \frac{C_1}{F_1} * \frac{W_1}{W_2}$$

7.2. CONTENIDO PARA PRODUCTO TERMINADO

$$\begin{array}{l} \text{mg de Carbinoxamina/cápsula} \\ \text{maleato} \end{array} = \frac{C_2}{F_2} * \frac{W_1}{25} * \frac{4}{W_5} * \frac{W_6}{Fr}$$

7.3. CONTENIDO PARA PROCESO

$$\begin{array}{l} \text{mg de Carbinoxamina/gr} \\ \text{maleato} \end{array} = \frac{C_2}{F_2} * \frac{W_1}{25} * \frac{4}{W_5} * \frac{1}{Fr}$$

Donde:

W_3 = peso de estándar interno en mg.

W_2 = peso de Carbinoxamina maleato (substancia de referencia) en mg.

W_5 = peso de muestra en gr.

W_6 = peso promedio del llenado de cápsula en gr.

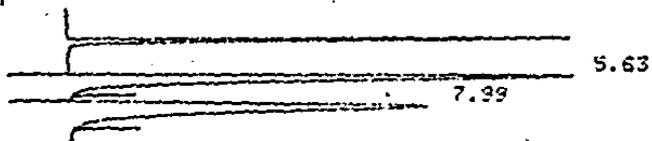
C_1 = promedio del porcentaje de área de Carbinoxamina maleato en la solución Factor respuesta.

F_1 = promedio del porcentaje de área de Feniramina maleato en la solución Factor respuesta.

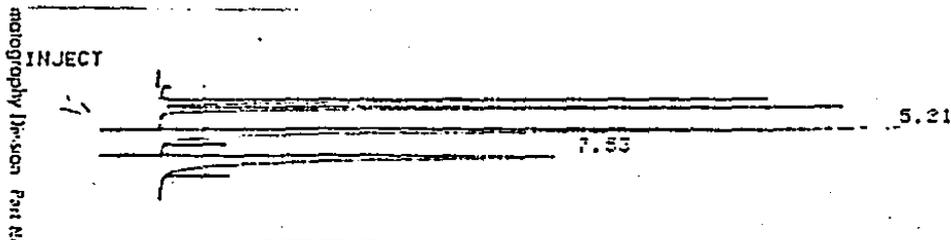
C_2 = promedio del porcentaje de área de Carbinoxamina maleato en la solución problema.

F_2 = promedio del porcentaje de área de Feniramina maleato en la solución problema.

INJECT



Cromatograma obtenido de la solución problema de proceso.
Feniramina maleato (estándar interno) T.R. = 5.63
Carbinoxamina maleato T.R. = 7.99



Cromatograma obtenido de la solución problema de producto terminado.

Feniramina maleato (estándar interno) T.R. = 5.21

Carbinoxamina maleato T.R. = 7.53

4.- RESULTADOS

A. Producto Terminado.

4.A.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA PRODUCTO TERMINADO

Se corrió la linealidad para el activo contenido - en la forma farmacéutica de producto terminado, siguiendo el método analítico desarrollado.

Se prepararon soluciones a concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, usando estándares de referencia.

A continuación se muestran los resultados:

LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA PRODUCTO TERMINADO

1) Tabulación de resultados:

| Concentración mg/ml adicionados a partir de la sol. patrón | Propiedad medida: mg/ml recuperados |
|---|--|
|---|--|

$x_1 = 0.16$

$y_{11} = 0.15872$

$x_2 = 0.24$

$y_{21} = 0.23736$

$x_3 = 0.32$

$y_{31} = 0.32416$

$x_4 = 0.40$

$y_{41} = 0.4008$

$x_5 = 0.48$

$y_{51} = 0.48192$

El 100% de la dosis corresponde a x_3

$t = 5$

$n = 1$

2) Cálculos preliminares:

$S_x = 1(0.16+0.24+0.32+0.40+0.48) =$

$S_x = 1.6$

$S_x^2 = 1 [(0.16)^2+(0.24)^2+(0.32)^2+(0.40)^2+(0.48)^2] =$

$S_x^2 = 0.5760$

$S_y = 0.15872 + 0.23736 + 0.32416 + 0.4008 + 0.48192 =$

$S_y = 1.602960$

$S_y^2 = (0.15872)^2+(0.23736)^2+(0.32416)^2+(0.4008)^2+(0.48192)^2 =$

$S_y^2 = 0.579499$

$$S_{xy} = 0.16(0.15872)+0.24(0.23736)+0.32(0.32416)+0.40(0.4008) \\ + 0.48(0.48192) =$$

$S_{xy} = 0.577734$

$$m = \frac{(1)(5)(.577734) - (1.6)(1.60296)}{(1)(5)(0.576) - (1.6)^2}$$

$$m = 1.012294$$

3) Cálculos finales:

$$b = \frac{1.60296 - (0.012294)(1.6)}{(5)(1)}$$

$$b = -0.003342$$

$$r^2 = \frac{[(5)(1)(0.577734) - (1.6)(1.60296)]^2}{[(5)(1)(0.576) - (1.6)^2][(5)(1)(0.579499) - (1.60296)^2]}$$

$$r^2 = 0.99965$$

RESULTADOS:

$$b = -0.003342$$

$$m = 1.012294$$

$$r^2 = 0.99965$$

Ya que: $m \approx 1$, $b \approx 0$ y $r^2 > 0.99$, se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

4.A.2. PRECISION DEL SISTEMA PARA PRODUCTO TERMINADO

Se trabajó el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema; los resultados se muestran a continuación:

4.A.2. PRECISION DEL SISTEMA PARA PRODUCTO TERMINADO

1) Tabla del porciento recuperado relativo:

99.97%, 99.74%, 99.95%, 99.89%, 99.81%, 100.36%

N = 6

2) Cálculos preliminares:

$$S_y = 99.97 + 99.74 + 99.95 + 99.89 + 99.81 + 100.36 = 599.72$$

$$S_y^2 = (99.97)^2 + (99.74)^2 + (99.95)^2 + (99.89)^2 + (99.81)^2 + (100.36)^2 =$$

$$S_y^2 = 59944.2488$$

$$\bar{y} = \frac{599.72}{6} = 99.95333$$

$$DE = \left[\frac{(6)(59944.2488) - (599.72)^2}{(6)(5)} \right]^{1/2} = 0.21713283$$

3) Cálculos finales:

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{0.21713283}{99.953333} * 100 = 0.2172 \%$$

PRECISION DEL SISTEMA

Resultados:

(CV) Coeficiente de Variación = 0.217234 %

Se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

4.A.3. LINEALIDAD DEL METODO PARA PRODUCTO TERMINADO

Se trabajó con placebos adicionados del principio activo, a tres diferentes concentraciones: -- 80%, 100%, 120%, haciendo el análisis por triplicado para cada concentración.

4.A.3. LINEALIDAD DEL METODO

A. Cantidad adicionada - Cantidad Recuperada

1) Tabla de cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

| Cant. adicionada (x) | Cantidad recuperada (y) |
|----------------------|---|
| $x_1 = 80\%$ | $y_{11}=79.97\%$ $y_{12}=80.05\%$ $y_{13}=80.1\%$ |
| $x_2 = 100\%$ | $y_{21}=100.02\%$ $y_{22}=100.18\%$ $y_{23}=100.4\%$ |
| $x_3 = 120\%$ | $y_{31}=120.15\%$ $y_{32}=120.06\%$ $y_{33}=119.92\%$ |

$$t = 3$$

$$n = 3$$

2) Cálculos preliminares:

$$S_x = (3)(80 + 100 + 120) = 900$$

$$S_x^2 = 3 [(80)^2 + (100)^2 + (120)^2] = 92\ 400.00$$

$$S_y = (79.97+80.05+80.1+100.02+100.18+100.4+120.15+120.06+119.92)$$

$$S_y = 900.85$$

$$S_y^2 = (79.97)^2 + (80.05)^2 + (80.1)^2 + (100.02)^2 + (100.18)^2 + (100.4)^2 + (120.15)^2 + (120.06)^2 + (119.92)^2 = 92570.6387$$

$$S_{xy} = 80 (79.97+80.05+80.1) + 100(100.02+100.18+100.4) + 120(120.15+120.06+119.92) =$$

$$S_{xy} = 92485.20$$

3) Cálculos finales:

$$m = \frac{(3)(3)(92485.2) - (900)(900.85)}{(3)(3)(92400) - (900)^2}$$

$$m = 1.00008333$$

$$b = \frac{(900.85) - (1.00008333)(900)}{(3)(3)}$$

$$b = 0.08611114$$

$$r^2 = \frac{[(3)(3)(92485.2) - (900)(900.85)]^2}{[(3)(3)(92400) - (900)^2][(3)(3)(92570.6387) - (900.85)^2]}$$

$$r^2 = 0.99993401$$

4.A.4. PORCIENTO RECUPERADO PARA PRODUCTO TERMINADO

Cálculo del porcentaje recuperado, para cada cantidad recuperada:

$$R_1 = \frac{79.97}{80} * 100 = 99.96\%$$

$$R_2 = \frac{80.05}{80} * 100 = 100.06\%$$

$$R_3 = \frac{80.01}{80} * 100 = 100.12\%$$

$$R_4 = \frac{100.02}{100} * 100 = 100.02\%$$

$$R_5 = \frac{100.18}{100} * 100 = 100.18\%$$

$$R_6 = \frac{100.4}{100} * 100 = 100.4 \%$$

$$R_7 = \frac{120.15}{120} * 100 = 100.12\%$$

$$R_8 = \frac{120.06}{120} * 100 = 100.05\%$$

$$R_9 = \frac{119.92}{120} * 100 = 99.93 \%$$

1) Tabular los resultados

99.96, 100.06, 100.12, 100.02, 100.18, 100.4, 100.12,
100.05, 99.93

N = 9

2) Cálculos preliminares:

$$SR = (99.96+100.06+100.12+100.02+100.18+100.4+100.12+100.05+99.93) = 990.84$$

$$SR^2 = (99.96)^2 + (100.06)^2 + (100.12)^2 + (100.02)^2 + (100.18)^2 + (100.4)^2 + (100.12)^2 + (100.05)^2 + (99.93)^2 = 90168.231$$

$$\bar{R} = \frac{990.84}{9} = 100.09$$

$$DE = \left[\frac{(9)(90168.231) - (990.84)^2}{9(9-1)} \right]^{1/2} = 0.13955304$$

3) Cálculos finales:

Intervalo de confianza para la media:

$$t = 2.306$$

$$IC = 100.09 \pm 2.306 \frac{0.13955304}{(9)^{1/2}}$$

$$= 100.09 \pm 0.10726977$$

$$IC = 99.98 \text{ a } 100.19$$

Coefficiente de Variación

$$CV = \frac{0.13955304}{100.09} * 100 = 0.1394\%$$

RESULTADOS:

$$m = 1.00008333$$

$$b = 0.08611114$$

$$r^2 = 0.99993401$$

$$CV = 0.139400\%$$

Intervalo de confianza para la media del por--
ciento recuperado = 99.98% a 100.19%

Ya que: $m \approx 1$

$$b \approx 0$$

$$r^2 > 0.98$$

$$CV < 2\%$$

En el intervalo de confianza para la media -
del porcentaje recuperado se localiza el 100%.

Se cumple con los criterios para linealidad -
del método.

4.A.5. EXACTITUD AL 100% PARA PRODUCTO TERMINADO

Se analizaron seis placebos cargados con el 100% - del principio activo de manera independiente, por - un mismo analista y bajo las mismas condiciones - de operación.

4.A.5. EXACTITUD AL 100% PARA PRODUCTO TERMINADO

1) Tabla del porciento recuperado al 100%

99.96%, 99.56%, 100.02%, 100.18%, 100.4%, 99.58%

2) Cálculos preliminares:

$$SR = 99.66 + 99.56 + 100.02 + 100.18 + 100.4 + 99.58 = 599.50$$

$$SR^2 = (99.66)^2 + (99.56)^2 + (100.02)^2 + (100.18)^2 + (100.4)^2 + (99.58)^2 =$$

$$SR^2 = 59900.7724$$

$$\bar{R} = \frac{599.50}{6} = 99.87$$

$$DE = \left[\frac{(6)(59900.7724) - (599.50)^2}{(6)(5)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.394901$$

3) Cálculos finales:

$$CV = \frac{0.394901}{99.87} * 100$$

$$CV = 0.3954\%$$

Intervalo de confianza para la media:

$$t = 2.5706$$

$$IC = 99.87 \pm 2.5706 \frac{0.394901}{6^{1/2}}$$

$$IC = 99.45 \text{ a } 100.28$$

RESULTADOS:

Intervalo de confianza para la media de exactitud_
al 100% = 99.45% a 100.28%

CV = 0.3954%

Ya que en el intervalo de confianza para la media_
es la exactitud al 100% se localiza el 100% y el -
CV < 2%, se cumple con el criterio para la exac-
titud al 100%.

4.A.6. PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) PARA PRODUCTO TERMINADO

Se prepararon tres muestras para producto terminado de un mismo lote conforme al método desarrollado.

El ensayo se llevó a cabo en dos días diferentes, por dos analistas; y en las mismas condiciones de operación; en la siguiente tabla se muestran los resultados:

4.A.6. PRECISION (REPRODUCTIBILIDAD) PARA PRODUCTO TERMINADO

1) Tabla de resultados:

ANALISTA

| | 1 | 2 |
|---|---------------------|----------------------|
| | $y_{111} = 105.5\%$ | $y_{211} = 106.5\%$ |
| 1 | $y_{112} = 105.4\%$ | $y_{212} = 106.41\%$ |
| | $y_{113} = 105.7\%$ | $y_{213} = 106.7\%$ |

DTA

| | | |
|---|----------------------|----------------------|
| | $y_{121} = 105.9\%$ | $y_{221} = 106.7\%$ |
| 2 | $y_{122} = 105.23\%$ | $y_{222} = 106.02\%$ |
| | $y_{123} = 105.1\%$ | $y_{223} = 106.11\%$ |

2) Cálculos preliminares:

$$y... = 105.5+105.4+105.7+105.9+105.23+105.1+106.5+106.41 \\ 106.7+106.7+106.02+106.11 = 1271.27$$

$$s_y^2 = (105.5)^2+(105.4)^2+(105.7)^2+(105.9)^2+(105.23)^2+(105.1)^2+ \\ (106.5)^2+(106.41)^2+(106.7)^2+(106.7)^2+(106.02)^2+(106.11)^2 =$$

$$s_y^2 = 134680.7635$$

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) PARA PRODUCTO TERMINADO

$$\bar{y} = \frac{1271.27}{12} = 105.94$$

$$DE = \left[\frac{(12)(134680.7635) - (1271.27)^2}{(12)(12 - 1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.56238871$$

3) Cálculos finales:

$$CV = \frac{0.56238871}{105.94} * 100$$

$$CV = 0.5308\%$$

RESULTADOS:

CV = 0.5308%

**Ya que el CV < 2%, se cumple con el criterio -
para precisión (reproducibilidad).**

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) PARA PRODUCTO TERMINADO

Cálculos de repetibilidad, reproducibilidad interdia/analista y reproducibilidad interanalista:

1) Cálculos preliminares:

$$Y_{11} = 105.5 + 105.4 + 105.7 = 316.60$$

$$Y_{12} = 105.9 + 105.23 + 105.1 = 316.23$$

$$Y_{21} = 106.5 + 106.41 + 106.7 = 319.61$$

$$Y_{22} = 106.7 + 106.02 + 106.11 = 318.83$$

$$S_{y_d/a}^2 = (316.6)^2 + (316.23)^2 + (319.61)^2 + (318.83)^2 = 404040.0939$$

$$y_1 = 316.60 + 316.23 = 632.83$$

$$y_2 = 319.61 + 318.83 = 638.44$$

$$S_{y_a}^2 = (632.83)^2 + (638.44)^2 = 808079.4425$$

Varianza debida al método:

$$S_m^2 = \frac{134680.7635 - (404040.0939/3)}{8} = 0.091525$$

Varianza debida al dia/analista:

$$S_{d/a}^2 = \frac{(404040.0939)/3 - (808079.4425)/6}{6} = \frac{134680.7635 - (404040.0939)/3}{24}$$

$$S_{d/a}^2 = -0.00980833$$

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) PARA PRODUCTO TERMINADO

Varianza debida al analista:

$$S_a^2 = \frac{(808079.4425)/6 - (1271.27)^2/12}{6} = \frac{(404040.0939)/3 - (808079.4425)/6}{12}$$

$$S_a^2 = 0.42676667$$

2) Cálculos finales:

Ya que $S_{d/a}^2 < 0$ entonces $S_{d/a}^2 = S_m^2$

$$\begin{aligned} \text{Repetibilidad } \pm 1.96(0.09152)^{1/2} \\ = \pm 0.592960 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Reproducibilidad interdia/analista } \pm 1.96(0.091525)^{1/2} \\ = \pm 0.592960 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Reproducibilidad interanalista } \pm 1.96(0.42676667)^{1/2} \\ = \pm 1.280416 \end{aligned}$$

4.A.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA PRODUCTO
TERMINADO

Las condiciones que se manejaron en este --
punto fueron las siguientes:

- Temperatura ambiente por 24 hrs.
- Temperatura ambiente por 72 hrs.
- Refrigeración por 24 hrs.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA PRODUCTO TERMINADO

1) Tabular los resultados:

| CONDICION/TIEMPO | | | |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| INICIAL | T.A./24 hrs. | T.A./24 hrs. | REF./24 hrs. |
| 102.96% | 102.95% | 102.94% | 103.23% |
| 103.8 % | 103.94% | 104.28% | 103.84% |
| 103.9 % | 103.88% | 103.71% | 103.65% |

2) Cálculos preliminares:

| | | | | |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| MEDIA | $\bar{Y}_0 = 103.55\%$ | $\bar{Y}_1 = 103.59\%$ | $\bar{Y}_2 = 103.64\%$ | $\bar{Y}_3 = 103.57\%$ |
| VARIANZA | $S_0^2 = 0.2665$ | $S_1^2 = 0.3081$ | $S_2^2 = 0.4522$ | $S_3^2 = 0.0974$ |

Varianza ponderada:

$$S_p = \frac{2(0.2665 + 0.3081 + 0.4522 + 0.0974)}{2(3+1)}$$

$$S_p = 0.28105$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA PRODUCTO TERMINADO

3) Cálculos finales:

Para T.A./24 hs.

$$IC = (103.59 - 103.55) \pm 2.56 [0.28105(2/3)]^{1/2}$$

$$IC = -1.0681 \text{ a } 1.1481$$

Para T.A/72 hs.

$$IC = (103.64 - 103.55) \pm 2.56 [0.28105(2/3)]^{1/2}$$

$$IC = -1.0181 \text{ a } 1.1981$$

Para REF./24 hs.

$$IC = (103.57 - 103.55) \pm 2.56 [0.28105(2/3)]^{1/2}$$

$$IC = -1.0881 \text{ a } 1.1281$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA PRODUCTO TERMINADO

RESULTADOS:

Para T.A./24 hrs.

La muestra es estable hasta antes de inyectar al - cromatógrafo, a condiciones ambientales por 24 hs., ya - que en el intervalo de confianza se incluye el valor de - cero.

Para T.A./72 hrs.

La muestra es estable hasta antes de inyectar al - cromatógrafo, a condiciones ambientales por 72 hrs., ya - que en el intervalo de confianza se incluye el valor de - cero.

Para REF./24 hrs.

La muestra es estable hasta antes de inyectar al - cromatógrafo, a condiciones de refrigeración por 24 hrs., ya que en el intervalo de confianza se incluye el va - lor de cero.

4.A.8. ESPECIFICIDAD

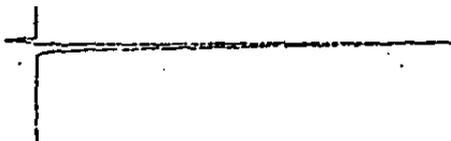
Se identificaron las respuestas del activo, estándar interno, excipientes, así como de otras sustancias presentes en la formulación.

INJECT

Cromatograma obtenido de la respuesta de excipientes de -
la formulación de producto terminado.

INJECT

E.A.



Cromatograma obtenido de la respuesta de Fenilpropanolamina clorhidrato (estándar de referencia), substancia presente en la formulación de producto terminado.

INJECT

E.T.



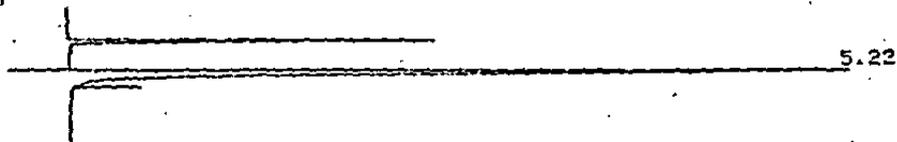
Cromatograma obtenido de la respuesta de Fenilefrina - -
clorhidrato (estándar de referencia), substancia presente
en la formulación de producto terminado.

INJECT

ED

Cromatograma obtenido de la respuesta de Fenilpropanolami
na clorhidrato (estándar de referencia) y Fenilefrina --
clorhidrato (estándar de referencia), sustancias presen-
tes en la formulación de producto terminado.

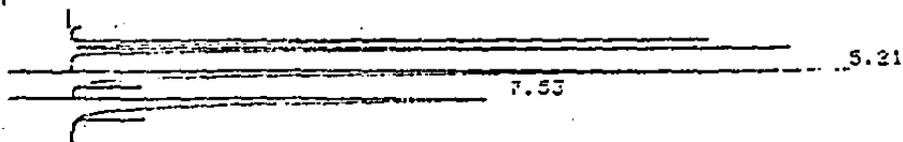
INJECT



Cromatograma obtenido de la respuesta de Feniramina maleato
to (estándar interno) T.R. = 5.22

Chromatography Division Part II

INJECT



Cromatograma obtenido de la solución problema de producto terminado.

Feniramina maleato (estándar interno) T.R. = 5.21

Carbinoxamina maleato T.R. = 7.53

4.- RESULTADOS

B. PROCESO

4.B.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA PROCESO

Se corrió la linealidad para el activo contenido - en la forma farmacéutica en proceso, siguiendo el método analítico desarrollado.

Se prepararon soluciones a concentraciones de 50% , 75%, 100%, 125% y 150%, usando estándares de referencia.

Los resultados se muestran a continuación:

4.B.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA PROCESO

1) Tabulación de resultados:

| Concentración mg/ml adicionados a partir de la sol. patrón | Propiedad medida: mg/ml recuperados |
|---|--|
| $X_1 = 0.16$ | $Y_{11} = 0.15872$ |
| $X_2 = 0.24$ | $Y_{21} = 0.23736$ |
| $X_3 = 0.32$ | $Y_{31} = 0.32416$ |
| $X_4 = 0.40$ | $Y_{41} = 0.4008$ |
| $X_5 = 0.48$ | $Y_{51} = 0.48192$ |

El 100% de la dosis corresponde a X_3

$$t = 5$$

$$n = 1$$

2) Cálculos preliminares:

$$S_x = 1(0.16+0.24+0.32+0.40+0.48) =$$

$$S_x = 1.6$$

$$S_x^2 = 1[(0.16)^2 + (0.24)^2 + (0.32)^2 + (0.40)^2 + (0.48)^2] =$$

$$S_x^2 = 0.5760$$

$$S_y = 0.15872 + 0.23736 + 0.32416 + 0.4008 + 0.48192 =$$

$$S_y = 1.60296$$

$$S_y^2 = (0.15872)^2 + (0.23736)^2 + (0.32416)^2 + (0.4008)^2 + (0.48192)^2 =$$

$$S_y^2 = 0.579499$$

$$S_{xy} = [0.16(0.15872) + 0.24(0.23736) + 0.32(0.32416) + 0.40(0.40080) + 0.48(0.48192)] =$$

$$S_{xy} = 0.577734$$

$$m = \frac{(1)(5)(0.577734) - (1.6)(1.60296)}{(1)(5)(0.576) - (1.6)^2}$$

$$m = 1.012294$$

3) Cálculos finales:

$$b = \frac{1.60296 - 1.012294(1.6)}{(5)(1)}$$

$$b = -0.003342$$

$$r^2 = \frac{[(5)(1)(0.577734) - (1.6)(1.60296)]^2}{[(5)(1)(0.576) - (1.6)^2][[(5)(1)(0.579499) - (1.60296)^2]}$$

$$r^2 = 0.99965$$

RESULTADOS:

$$m = 1.012294$$

$$b = -0.003342$$

$$r^2 = 0.99965$$

Ya que $b \approx 0$, $m \approx 1$ y $r^2 > 0.99$, se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

4.B.2. PRECISION DEL SISTEMA PARA PROCESO

Se trabajó el análisis sextuplicado de una misma - solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema; los resultados se muestran a continuación:

4.B.2. PRECISION DEL SISTEMA PARA PROCESO

1) Tabla del porcentaje recuperado relativo:

99.97%, 99.74%, 99.95%, 99.89%, 99.81%, 100.36%

N = 6

2) Cálculos preliminares:

$$S_y = 99.97 + 99.74 + 99.95 + 99.89 + 99.81 + 100.36 = 599.72$$

$$S_y^2 = (99.97)^2 + (99.74)^2 + (99.95)^2 + (99.89)^2 + (99.81)^2 + (100.36)^2 =$$

$$S_y^2 = 59944.2488$$

$$\bar{y} = \frac{599.72}{6} = 99.95333$$

$$DE = \left[\frac{(6)(59944.2488) - (599.72)^2}{(6)(5)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.21713283$$

3) Cálculos finales:

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{0.21713283}{99.953333} \cdot 100 = 0.2172\%$$

RESULTADOS

Coeficiente de Variación (CV) = 0.217234%

**Ya que el Coeficiente de Variación es $< 2\%$ se cumple -
con el criterio para Precisión del Sistema.**

4.B.3. LINEALIDAD DEL METODO PARA PROCESO

Se trabajó con placebos adicionados del principio activo, a tres diferentes concentraciones: 80%, 100%, 120%, haciendo el análisis por triplicado para cada concentración.

4.B.3. LINEALIDAD DEL METODO PARA PROCESO

A. Cantidad adicionada - Cantidad recuperada

1) Tabla de cantidad adicionada contra cantidad recuperada

| Cant. adicionada (X) | Cant. recuperada (Y) |
|----------------------|--|
| $X_1 = 80\%$ | $Y_{11}=80.02\%$ $Y_{12}=80.05\%$ $Y_{13}=80.02\%$ |
| $X_2 = 100\%$ | $Y_{21}=100.3\%$ $Y_{22}=100.09\%$ $Y_{23}=99.85\%$ |
| $X_3 = 120\%$ | $Y_{31}=119.98\%$ $Y_{32}=120.02\%$ $Y_{33}=120.1\%$ |

$$t = 3$$

$$n = 3$$

2) Cálculos preliminares:

$$S_x = (3)(80+100+120) = 900$$

$$S_x^2 = 3[(80)^2 + (100)^2 + (120)^2] = 92\,400.0$$

$$S_y = (80.02+80.05+80.02+100.3+100.09+99.85+119.98+120.02 \\ +120.1) =$$

$$S_y = 900.43$$

$$S_y^2 = (80.02)^2 + (80.05)^2 + (80.02)^2 + (100.3)^2 + (100.09)^2 + (99.85)^2 \\ + (119.98)^2 + (120.02)^2 + (120.1)^2 =$$

$$S_y^2 = 92486.5347$$

$$S_{xy} = 80(80.02+80.05+80.02) + 100(100.3+100.09+99.85) + 120(119.98 \\ +120.02+120.1) =$$

$$S_{xy} = 92\,443.20$$

3) Cálculos finales:

$$m = \frac{(3)(3)(92\ 443.20) - (900)(900.43)}{(3)(3)(92\ 400) - (900)^2}$$

$$m = 1.00008333$$

$$b = \frac{(900.43) - (1.00008333)(900)}{(3)(3)}$$

$$b = 0.039444$$

$$r^2 = \frac{[(3)(3)(92\ 443.20) - (900)(900.43)]^2}{[(3)(3)(92\ 400) - (900)^2][(3)(3)(92486.5347) - (900.43)^2]}$$

$$r^2 = 0.99995245$$

4.B.4. PORCIENTO RECUPERADO

Cálculo del porcentaje recuperado para cada cantidad recuperada:

$$R_1 = \frac{80.02}{80.0} * 100 = 100.025 \%$$

$$R_2 = \frac{80.05}{80.0} * 100 = 100.0625\%$$

$$R_3 = \frac{80.02}{80.0} * 100 = 100.025 \%$$

$$R_4 = \frac{100.03}{100.0} * 100 = 100.03 \%$$

$$R_5 = \frac{100.09}{100.0} * 100 = 100.09 \%$$

$$R_6 = \frac{99.85}{100.0} * 100 = 99.85 \%$$

$$R_7 = \frac{119.98}{120.0} * 100 = 99.98 \%$$

$$R_8 = \frac{120.02}{120.0} * 100 = 100.02 \%$$

$$R_9 = \frac{120.1}{120.0} * 100 = 100.08 \%$$

1) Tabular los resultados:

100.025, 100.0625, 100.025, 100.3, 100.09, 99.85, 99.98, 100.2, 100.08

N = 9

2) Cálculos preliminares:

$$SR = (100.025+100.0625+100.025+100.3+100.09+99.85+99.98+100.02+100.08)=$$

$$SR = 900.4325$$

$$SR^2 = (100.025)^2 + (100.0625)^2 + (100.025)^2 + (100.3)^2 + (100.09)^2 + (99.85)^2 \\ + (99.98)^2 + (100.02)^2 + (100.08)^2 =$$

$$SR^2 = 90086.63296$$

$$\bar{R} = \frac{900.4325}{9} = 100.048$$

$$DE = \left[\frac{(9)(90086.63296) - (900.4325)^2}{(9)(9-1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.118414$$

3) Cálculos finales:

Intervalo de confianza para la media:

$$t = 2.306$$

$$IC = 100.048 \pm 2.306 * \frac{0.118414}{9^{1/2}}$$

$$IC = 100.048 \pm 0.09102$$

$$IC = 99.96 \text{ a } 100.14$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{0.118414}{100.048} * 100 = 0.1183\%$$

RESULTADOS

$$m = 1.000083333$$

$$b = 0.039444$$

$$r^2 = 0.99995245$$

$$CV = 0.1183\%$$

Intervalo de confianza para la media: 99.96 a 100.14

Ya que: $m \approx 1$, $b \approx 0$, $r^2 > 0.98$, $CV < 2\%$ y en el intervalo de confianza para la media se localiza el 100%, se cumple con los criterios para Linealidad del método.

4.B.5. EXACTITUD AL 100% PARA PROCESO

Se analizaron seis placebos cargados con el 100% - del principio activo de manera independiente, por - un mismo analista y bajo las mismas condiciones - de operación.

4.B.5. EXACTITUD AL 100% PARA PROCESO

1) Tabla del porciento recuperado al 100%

99.46, 99.46, 100.3, 100.42, 100.09, 99.85

2) Cálculos preliminares:

$$SR = 99.46 + 99.46 + 100.3 + 100.42 + 100.09 + 99.85 = 599.58$$

$$SR^2 = (99.46)^2 + (99.46)^2 + (100.3)^2 + (100.42)^2 + (100.09)^2 + (99.85)^2 =$$

$$SR^2 = 59\ 916.88$$

$$\bar{R} = \frac{599.58}{6} = 99.83$$

$$DE = \left[\frac{(6)(59\ 916.88) - (599.58)^2}{(6)(6 - 1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.4124$$

3) Cálculos finales:

Intervalo de confianza para la media:

$$IC = 99.93 \pm 2.5706 \frac{0.4124}{6^{1/2}}$$

$$IC = 99.497 \text{ a } 100.363$$

$$CV = \frac{0.4124}{99.93} * 100 = 0.4126\%$$

RESULTADOS

Intervalo de confianza para la media = 99.497 a 100.363

Coefficiente de Variación (CV) = 0.4126%

Ya que en el intervalo de confianza para la media se localiza el 100% y el $CV < 2\%$, se cumple con el criterio para Exactitud al 100%.

4.8.6.. PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) PARA PROCESO

Se prepararon tres muestras para proceso de un mismo lote conforme al método desarrollado.

El ensayo se llevó a cabo en dos días diferentes, por dos analistas, y en las mismas condiciones de operación; en la siguiente tabla se muestran los resultados:

4.8.6. PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) PARA PROCESO

1) Tabla de resultados:

| | | ANALISTA | |
|----------|--|----------------------|----------------------|
| | | 1 | 2 |
| 1 | | $y_{111} = 107.51\%$ | $y_{211} = 107.71\%$ |
| | | $y_{112} = 107.69\%$ | $y_{212} = 107.88\%$ |
| | | $y_{113} = 107.84\%$ | $y_{213} = 107.94\%$ |
| DIA 2 | | $y_{121} = 106.55\%$ | $y_{221} = 107.1 \%$ |
| | | $y_{122} = 107.2 \%$ | $y_{222} = 107.48\%$ |
| | | $y_{123} = 107.06\%$ | $y_{223} = 107.55\%$ |

2) Cálculos preliminares:

$$y... = 107.51+107.69+107.84+106.55+107.2+107.06+107.71+107.88 \\ +107.94+107.1+107.48+107.55 = 1289.51$$

$$s_y^2 = (107.51)^2 + (107.69)^2 + (107.84)^2 + (106.55)^2 + (107.2)^2 + (107.06)^2 \\ + (107.71)^2 + (107.88)^2 + (107.94)^2 + (107.1)^2 + (107.48)^2 + (107.55)^2 =$$

$$s_y^2 = 138\ 571.5329$$

$$\bar{y} = \frac{1289.51}{12} = 107.45$$

$$DE = \left[\frac{(12)(138\ 571.5329) - (1289.51)^2}{(12)(12 - 1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.4115$$

3) Cálculos finales:

$$CV = \frac{0.4115}{107.45} * 100 = 0.383\%$$

RESULTADOS

CV = 0.383%

Ya que el CV < 2% se cumple con el criterio para Precisión (Reproducibilidad) del método.

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) PARA PROCESO

Cálculos de Repetibilidad, Reproducibilidad inter-día/analista y Reproducibilidad internalista.

1) Cálculos preliminares:

$$y_{11} = 107.51+107.69+107.84 = 323.04$$

$$y_{12} = 106.55+107.2+107.06 = 320.81$$

$$y_{21} = 107.71+107.88+107.94 = 323.53$$

$$y_{22} = 107.1+107.48+107.55 = 322.13$$

$$Sy^2(d/a) = (323.04)^2+(320.81)^2+(323.53)^2+(322.13)^2 + 415\ 713.2955$$

$$y_1 = 323.04 + 320.81 = 643.85$$

$$y_2 = 323.53 + 322.13 = 645.66$$

$$Sy^2_a = (643.85)^2+(645.66)^2 = 831\ 419.6581$$

Varianza debida al método:

$$s_m^2 = \frac{(138\ 571.5329) - (415\ 713.2955)/3}{8}$$

$$s_m^2 = 0.0543$$

Varianza debida al dfa/analista:

$$s^2(d/a) = \frac{415\,713.2955/3 - (831\,419.6581)/6}{6} - \frac{(138\,571.5329) - (415\,713.29)/3}{24}$$

$$s^2(d/a) = 0.1744$$

Varianza debida al analista:

$$s^2_a = \frac{(831\,419.658)/6 - (1289.51)^2/12}{6} - \frac{(415\,713.2955)/3 - (831\,419.6581)/6}{12}$$

$$s^2_a = - 0.05079$$

2) Cálculos finales:

Ya que $S^2_a < 0$ entonces: $S^2_a = S^2(d/a)$

$$\begin{aligned}\text{Repetibilidad} &= \pm 1.96(0.0543)^{1/2} \\ &= \pm 0.4567\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Reproducibilidad interdía/analista} &= \pm 1.96(0.1744)^{1/2} \\ &= \pm 0.8185\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Reproducibilidad interanalista} &= \pm 1.96(0.1744)^{1/2} \\ &= \pm 0.8185\end{aligned}$$

4.8.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA PROCESO

Las condiciones que se manejaron en este punto --
fueron:

- Temperatura ambiente por 24 hrs.
- Temperatura ambiente por 72 hrs.
- Refrigeración por 24 hrs.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA PROCESO

1) Tabular los resultados:

| INICIAL | CONDICION/TIEMPO | | |
|---------|------------------|-------------|-------------|
| | T.A./24 hs. | T.A./72 hs. | REF./24 hs. |
| 106.55% | 106.51% | 105.93% | 106.44% |
| 106.17% | 106.51% | 105.98% | 107.0 % |
| 106.15% | 106.84% | 106.86% | 107.12% |

2) Cálculos preliminares:

| | | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| MEDIA $\bar{Y}_0 = 106.29\%$ | $\bar{Y}_1 = 106.62\%$ | $\bar{Y}_2 = 106.26\%$ | $\bar{Y}_3 = 106.85\%$ |
| VARIANZA $S_0^2 = 0.0508$ | $S_1^2 = 0.0363$ | $S_2^2 = 0.2736$ | $S_3^2 = 0.1317$ |

Varianza ponderada:

$$S_p = \frac{2(0.0508 + 0.0363 + 0.2736 + 0.1317)}{2(3+1)}$$

$$S_p = 0.1231$$

3) Cálculos finales:

Para T.A./24 hs.

$$IC = (106.62 - 106.29) \pm 2.56 \quad [0.1231(2/3)]^{1/2}$$

$$IC = -0.4034 \text{ a } 1.0634$$

Para T.A./72 hs.

$$IC = (106.26 - 106.29) \pm 2.56 \quad [0.1231(2/3)]^{1/2}$$

$$IC = -0.7634 \text{ a } 0.7034$$

Para REF./24 hs.

$$IC = (106.85 - 106.29) \pm 2.56 \quad [0.1231(2/3)]^{1/2}$$

$$IC = -0.1734 \text{ a } 1.2934$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA PROCESO

RESULTADOS:

Para T.A./24 hs.

La muestra es estable hasta antes de inyectar al cromatógrafo, a condiciones ambientales por 24 hs., ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor de cero.

Para T.A./72 hs.

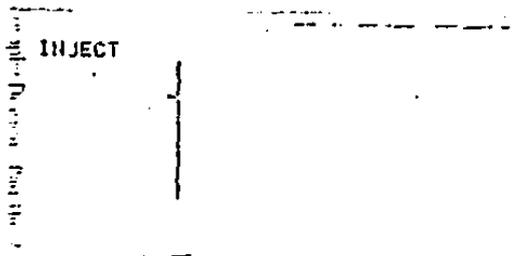
La muestra es estable hasta antes de inyectar al cromatógrafo, a condiciones ambientales por 72 hs., ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor de cero.

Para REF./24 hs.

La muestra es estable hasta antes de inyectar al cromatógrafo, a condiciones de refrigeración por 24 hs., ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor de cero.

4.B.8. ESPECIFICIDAD PARA PROCESO

Se identificaron las respuestas del activo, están dar interno y excipientes.



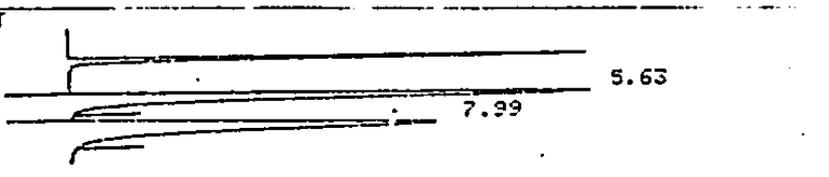
Cromatograma obtenido de la respuesta de excipientes de la formulación de proceso.

INJECT

5.22

Cromatograma obtenido de la respuesta de Feniramina maleato
(estándar interno) T.R. = 5.22

INJECT



5.63

7.99

Cromatograma obtenido de la solución problema de proceso.

Feniramina maleato (estándar interno) T.R. = 5.63

Carbinoxamina maleato T.R. = 7.99

5.- CONCLUSIONES.

Del análisis estadístico de los datos obtenidos - en el estudio de validación, se puede concluir que el método desarrollado presenta las siguientes características:

1.- Específico: Para cuantificar el activo contenido tanto en producto terminado como en proceso, ya que el método es capaz de separarlo de excipientes así como de otras sustancias presentes en la formulación.

2.- Lineal: Para el activo en cuestión, demostrado por los coeficientes de correlación obtenidos dentro de los límites estipulados para esta prueba.

3.- Exacto y Preciso: Porque se observa que los coeficientes de variación (CV) determinados a partir de los datos de recobros, a las concentraciones estudiadas, cumplen con el criterio establecido.

4.- Reproducible: Porque se obtuvieron coeficientes de variación (CV) dentro de límites establecidos, para determinaciones repetidas de un mismo lote, en cada una de las formulaciones estudiadas, en dos días diferentes.

Por lo anterior expuesto, se concluye que el método desarrollado es confiable, preciso, exacto y específico, pudiéndose ser utilizado para cuantificar maleato de carbinoxamina, tanto en proceso como en producto terminado, para una formulación sólida oral de liberación controlada, cumpliéndose con el objetivo de este trabajo.

* Quisiera hacer hincapié en el proceso de lavado al término del análisis, ya que de no hacerlo, nos afectaría considerablemente en el funcionamiento del equipo, así como en la vida útil de la columna.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1) US PHARMACOPEIA XXI, NATIONAL FORMULARY XVI
U. S. A.
Ed. Mack Publishing Co.
1985
- 2) THE INDEX - MERCK
Tenth Edition
Rahway, N.J., U.S.A.
Ed. Merck & Co., Inc.
1983
- 3) MARTINDALE - THE EXTRA PHARMACOPOEIA
Twenty -eighth Edition
London
Ed. The Pharmaceutical Press
1982
- 4) DRUG FACTS AND COMPARISONS
1984 Edition
U. S. A.
- 5) Lewis J. Arthur, González Gertrude Dittus, Winek Charles L.
MODERN DRUG ENCYCLOPEDIA AND THERAPEUTIC INDEX
U. S. A.
Ed. Yorke Medical Books, Technical Publishing
1981
- 6) Wilson y Gisvold's
TEXTBOOK OF ORGANIC MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY
Philadelphia, Toronto
Ed. J. B. Lippincott Company
1985

- 7) W.C. Bowman, N.J. Rand
FARMACOLOGIA BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS, APLICACIONES CLINICAS
Séptima Edición
México, D. F.
Ed. Interamericana
1984

- 8) Goodman y Gilman
LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA
Séptima Edición
Buenos Aires, Argentina
Ed. Médica Panamericana S. A.
1986.

- 9) AMA DRUG EVALUATIONS
Fourth Edition
U. S. A.
Ed. American Medical Association
1980

- 10) Graciela Aguilar Gil S.
REQUISITOS MINIMOS PARA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
1988

- 11) Edison Cid Cárcamo
CINETICA DE DISOLUCION DE MEDICAMENTOS
Washington, D.C.
Ed. Secretarfa General de la Organización de los Estados Americanos
1981

- 12) Madam, P. L.
LIBERACION PROLONGADA-PARTE 1-RESUMEN
Pharm. Mfg.
Vol. 2, Núm. 2
p. 23-27(5)
1985

- 13) REMINGTON 2 FARMACIA
17a. Edición
Buenos Aires, Argentina
Ed. Panamericana
1987

- 14) Helman José
FARMACOTECNIA TEORICA Y PRACTICA, TOMO VII
Tercera Impresión
México D. F.
Ed. Continental
1982

- 15) REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES
16th. edition
Easton, Pennsylvania
Ed. The Mack Publishing Company
1980

- 16) WATERS SOURCEBOOK OF CHROMATOGRAPHY COLUMNS AND SU--
PPLIES
U.S.A.
Millipore Corporation
1986

- 17) Harold M. Mc. Nair y Benjamin Esquivel H.
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION
Washington, D. C.
Ed. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos
1980
- 18) Karl Wessely, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn Karl -
Zech, Byk-Gulden Konstanz
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN PHARMACEU-
TICAL ANALYSES.
Western Germany
Ed. Hewlett-Packard GmbH, Böblingen
1979
- 19) Perkin-Elmer
INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA PRACTICA
U. S. A.
Ed. Perkin-Elmer Co.
1981
- 20) L.R. Snyder, J.J. Kirkland
INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY
Second Edition
U. S. A.
Ed. John Wiley & Sons, Inc.
1979.