

8 2ci



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**OPTIMIZACION Y VALIDACION DE LOS METODOS
ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DEL
DICLORHIDRATO DE ZIPEPROL Y DEL
ORTOSULFAGUAYACOLATO DE POTASIO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A

DULCE MARIA CORTES CRUZ

DIRECTOR DE TESIS

QFB JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS

FALLA DE ORIGEN



V N A M

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1980



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

Introducción	1
Objetivos	3
Generalidades	
a) Características Físicas y Químicas de los Activos	4
b) Farmacología	5
c) Valoración Acido Base en medio no acuoso	8
d) Espectrofotometría	11
e) Validación de Metodos Analíticos	14
Experimentación	21
Material y Métodos	28
Resultados	
a) Diclorhidrato de Zipeprol	33
b) Ortosulfaguayacolato de Potasio	39
Análisis de Resultados	47
Conclusiones	58
Figuras	60
Anexo 1	64
Anexo 2	65
Bibliografía	66

I N D I C E D E F I G U R A S

PAGINA	No. FIGURA	DESCRIPCION
4	1	Estructura del DZ.
4	2	Estructura del OSGP.
7	3	Estructura de la morfina y codeina.
7	4	Estructura de la meperidina.
7	5	Estructura de la piperazina.
11	6	Propiedades ondulatorias de la radiación electromagnética.
60	7	Espectro comparativo del estándar de OSGP y la muestra con método inicial
60	8	Espectro del azúcar refinada.
61	9	Espectro del metilparaben.
61	10	Espectros comparativos del estándar de OSGP y muestra tratada con método para DZ.
62	11	Espectro de lote placebo con método optimizado.
62	12	Espectros comparativos del estándar de OSGP y la muestra tratada con el método optimizado.
63	13	Espectro obtenidos en la prueba de reproducibilidad para OSGP.

I N D I C E D E T A B L A S

PAGINA	No. TABLA	DESCRIPCION
16	1	Requisitos para la Validación de Métodos Analíticos de acuerdo a USP XXI.
17	2	Resumen de Validación de Métodos Analíticos.
27	3	Esquemmatización para la Validación de los Métodos Analíticos optimizados.
33	4	Porcentaje recobrado con el método analítico inicial para DZ.
33	5	Porcentaje recobrado con el método analítico propuesto para DZ.
33	6	mg requeridos de DZ de acuerdo a porcentaje establecido.
34	7	Especificidad para placebos para DZ.
34	8	Especificidad para productos de degradación de DZ.
35	9	Porciento recuperado para un 90% de DZ.
36	10	Porciento recuperado para un 110 % de DZ.
35	11	Porciento recuperado para un 100 % de DZ.
37	12	Linealidad para DZ.
38	13	Reproducibilidad para DZ.
39	14	Estabilidad de la muestra para DZ.
39	15	Porciento recobrado de OSGP con el método analítico inicial.
39	16	Porciento recobrado de OSGP con el método analítico optimizado.
39	17	mg requeridos de acuerdo al porcentaje establecido de OSGP.
40	18	Especificidad para placebos de OSGP.
40	19	Especificidad para productos de degradación del OSGP.
41	20	Porciento recuperado del OSGP al 90 % .
42	21	Porciento recuperado del OSGP al 100 % .
41	22	Porciento recuperado del OSGP al 110 % .
43	23	Linealidad del OSGP.
44	24	Reproducibilidad del OSGP.
43	25	Estabilidad de la muestra del OSGP.
45	26	Resumen de resultados para DZ.
46	27	Resumen de resultados para OSGP.

I N T R O D U C C I O N

Validar, es un conjunto de pruebas que constituyen la evaluación crítica de la confiabilidad y la reproducibilidad de toda operación o proceso relacionado con la fabricación de medicamentos. Una validación específica es un estudio del comportamiento de un sistema analítico completo. El objetivo principal es la producción de mejores resultados, por tal razón todas las variables que afecten al sistema se deben considerar. Ya que validar implica garantizar, se debe partir de sistemas óptimos .

Con la validación se demuestra la capacidad del método a utilizar, es decir su capacidad de satisfacer los requisitos para su aplicación. Esto quedará expresado en términos de exactitud, precisión, especificidad, linealidad, reproducibilidad y límites de detección del método. La Industria Farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos para todos los productos, tanto los nuevos como los ya existentes, para así asegurar metodologías apropiadas y confiables (1) (2).

Este trabajo, es una optimización y validación de los métodos analíticos para la determinación del diclorhidrato de zipeprol (DZ) y del ortosulfaguayacolato de potasio (OSGP) en un jarabe. Ambos principios activos forman parte de la formulación y presentan acción terapéutica en el tracto respiratorio.

Los métodos analíticos con los que se determinaban presentan interferencias, así como baja capacidad de recobro. gasto de solventes, mayor tiempo y no presentan reproducibilidad. Para la determinación del DZ se requieren cinco extracciones con gran volumen de solvente, no se considera ningún cuidado en la técnica y los resultados obtenidos no son precisos. La determinación del orto sulfaquayacolato de potasio (OSGP) no se puede realizar por espectrofotometría porque uno de los excipientes interfiere en la lectura, existe un método alternativo pero requiere de una digestión previa a una precipitación con cloruro de bario. Sin embargo, los resultados no son reproducibles, el rendimiento es bajo y el tiempo aproximado del ensayo es de 24 horas.

En este trabajo se presenta la optimización del método para la determinación del DZ y para el OSGP se adapta la técnica propuesta por USP XXI para materia prima.

O B J E T I V O S

Realizar un trabajo de investigación que resuelva un problema específico a un laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica.

Optimizar y adecuar los métodos analíticos para la determinación del diclorhidrato de ziperol y el orto sulfaguayacolato de potasio en un jarabe.

Establecer un sistema de validación de métodos analíticos, considerando criterios establecidos.

Documentar y validar los métodos analíticos optimizados para garantizar su capacidad analítica.

GENERALIDADES

CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LOS ACTIVOS

DICLORHIDRATO DE ZIPEPROL

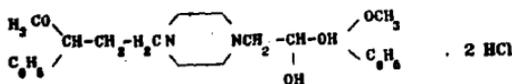
$C_{23}H_{32}N_2O_3 \cdot 2 HCl$

P.M. = 457.42

Diclorhidrato de 1-2-(metoxi-2-fenil-etil)-4-(2-hidroxi-3-metoxi-3-fenilpropil)-piperazina (4).

Polvo blanco, punto de fusión de 231 °C, muy estable en soluciones acuosas. DL 50 : 550 mg/kg. Uso: antitusivo.

FIGURA 1 : ESTRUCTURA DEL DICLORHIDRATO DE ZIPEPROL.



ORTOSULFAGUAYACOLATO DE POTASIO

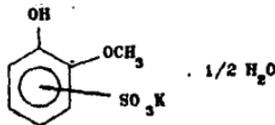
$C_7H_7KO_5S \cdot \frac{1}{2} H_2O$

P.M. = 242.3

Polvo blanco, ligeramente aromático, sabor dulce (4).

Soluble en 1/8 partes de agua, insoluble en alcohol, éter y aceites. Incompatible con sales férricas. Debe guardarse herméticamente y protegido de la luz. Uso: expectorante.

FIGURA 2 : ESTRUCTURA DEL ORTO SULFAGUAYACOLATO DE POTASIO.



GENERALIDADES

FARMACOLOGIA

DICLORHIDRATO DE ZIPEPROL (D.Z.)

Es un agente antitusivo no opiaseo, derivado de la piperazina (35). De acuerdo a varios estudios (37) se ha demostrado que su capacidad antitusiva es superior a la codeína y no presenta efectos tóxicos. Toyonari Toribatake, et al. (37), demostraron en un estudio realizado con cuyos, gatos y perros la superioridad de este agente con respecto a la codeína. Primero causaron una irritación eléctrica en el nervio superior de la laringe, en los gatos y una irritación mecánica en la mucosa traqueal, en perros y cuyos. Se les administró por vía intravenosa y oral el DZ y la codeína. Se midió la frecuencia de la tos a diferentes tiempos para ambas irritaciones y se compararon los resultados. Estos mostraron que con irritación mecánica y eléctrica la potencia del DZ fue el doble que el de la codeína. En cuanto a las diferentes vías de administración, la oral mostró una capacidad de absorción mayor que cualquier otra vía. No causó adicción, aún después de dosis repetidas. Además, mostró una acción espasmolítica muy marcada en la contracción de los músculos bronquiales, por esta razón se considera también un buen expectorante (FIG. 1) (36),(37).

Es uno de los tres tipos de fármacos que actúan sobre el tracto respiratorio. Se utiliza para supresión de la tos en caso de severidad y alta frecuencia. La potencia de estos

fármacos se expresa en función del grado de reducción de la intensidad y frecuencia de la tos (22),(20).(35).

Los agentes antitusivos están constituidos por tres grupos : alcaloides del opio, derivados de los alcaloides del opio y agentes sintéticos (22). El DZ es un agente sintético. Los alcaloides del opio son narcóticos que causan efectos secundarios importantes, además de adicción. Los más importantes son la morfina y la codeina (FIG. 3)(35),(22). Los derivados del opio presentan un incremento en su actividad analgésica, sus efectos secundarios son menores, pero prevalece la adicción. Como ejemplo son la meperidina y la metadona (FIG.4). Los derivados sintéticos se originan a partir de los analgésicos, espasmolíticos, antihistaminicos y fenotiazidas. No presentan efectos secundarios severos, ni adicción. Los grupos mas importantes ,son los ácidos fenilcicloalcanocarboxílicos, difenilpropanoles, derivados de la fenotiazina, derivados de la piridazina y de la piperazina (FIG.5) (21),(22).

ORTO SULFAGUAYACOLATO DE POTASIO (OSGP)

Es un expectorante, actúa por vía digestiva. Se puede combinar con agentes antitusivos, descongestionantes y broncodilatadores en jarabes. Boyd demostró que su actividad como expectorante en animales anestesiados es muy alta. Los estudios realizados en niños y en adultos no reportan efectos adversos, a pesar de no haber incremento en el volumen de

esputo (22). Chodosh (24) midió la viscosidad del esputo y observó que había un decremento con dosis de 300 a 600 mg, cuatro veces al día, sin embargo no demostró que afectara en la efectividad del OSGP (24),(35). Sin embargo, debido a la dificultad de obtener datos significativos de los estudios clínicos, la efectividad del OSGP no se ha establecido claramente en humanos (24),(21).

Este tipo de fármaco aumenta las secreciones traqueo-bronqueales, a la vez que disminuyen su viscosidad, facilitando su eliminación. El mucus secretado protege la mucosa inflamada, disminuyendo el reflejo tusígeno. Los expectorantes se originan de cuatro grupos : expectorantes salinos, nauseativos, saponinas y derivados del guayacol. El cloruro de amonio y los derivados del guayacol son los mas utilizados (21),(22). FIGURA 2.

FIGURA 3: ESTRUCTURA DE LA MORFINA (A) Y DE LA CODEINA (B).

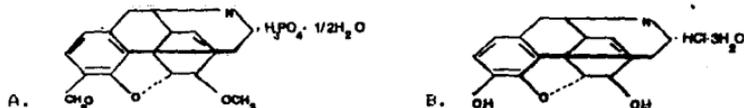


FIGURA 4: ESTRUCTURA DE LA MEPERIDINA.

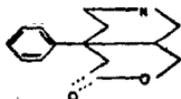


FIGURA 5: ESTRUCTURA DE LA PIPERAZINA.



GENERALIDADES

TITULACIONES ACIDO BASE EN MEDIO NO ACUOSO

Existen muchos disolventes orgánicos que pueden emplearse en las titulaciones ácido-base en lugar del agua. Este tipo de titulaciones tiene particular interés para la Industria Farmacéutica debido a que muchos de los principios activos son ácidos o bases muy débiles y que además son insolubles o presentan una debilidad limitada en medio acuoso (7). Los disolventes no acuosos son muy versátiles porque sus propiedades modifican a las de otros compuestos haciendo posible reacciones que en medio acuoso no serían posibles (8). La elección adecuada de solventes, de titulantes y de indicadores es fundamental para el éxito de estas determinaciones. Para poder elegir satisfactoriamente el solvente mas adecuado para la titulación se deben considerar sus propiedades ácido base, su constante dieléctrica (7),(8) (9) y los cuidados necesarios para mantener un medio anhidro.

Las propiedades ácidas o básicas de los disolventes incrementan o disminuyen la fuerza ácida o básica de los solutos porque influyen directamente sobre su constante dieléctrica . De tal forma que los solutos que son ácido débiles en agua muestran constantes de disociación mas bajas en disolventes fuertemente ácidos (9),(11),(12).

La constante dieléctrica es la capacidad de aislamiento del disolvente (11). Representa la cantidad de trabajo

requerido para separar, en el proceso de disociación, las dos partículas de cargas opuestas de un soluto en un disolvente en particular.

El grado de cuantitatividad está dado por la constante de disociación de la base débil y la de autoprotólisis del agua. En medio no acuoso la constante de equilibrio está dada por la constante de disociación de la base débil en ácido acético glacial y por la constante de autoprotólisis en el mismo solvente. Esto da como resultado una constante de equilibrio mayor para medio no acuoso que para medio acuoso debido a las propiedades de ácido fuerte que presenta el ácido acético glacial y por lo tanto una titulación más exacta en el punto de equivalencia (9),(11),(12).

La elección de los TITULANTES depende de la naturaleza de lo que se va a titular, ya sea ácido o base. Para obtener un punto final pronunciado al titular una base débil se deben elegir las condiciones de tal manera que el equilibrio se desplace hacia la derecha tanto como sea posible. Esto se logra titulado con un ácido tan fuerte como sea posible y un disolvente que no sea básico para que la basicidad del disolvente no invierta la reacción de titulación cerca del punto de equivalencia, produciendo así un punto final poco notorio. (11)

Para titular una base débil el titulante debe ser un ácido lo más fuerte posible (9). El agua iguala el grado de acidez de los ácidos fuertes. El ácido acético glacial es un disolvente autoionizado que esencialmente no tiene basicidad

y que no iguala el grado de acidez de los ácidos fuertes. En este ácido el ácido perclórico (HClO_4) es más fuerte que el clorhídrico o el sulfúrico y mucho más fuerte que el nítrico. Por este motivo se emplea el ácido perclórico como titulante (11).

Para detectar los puntos finales de las titulaciones en disolventes no acuosos se pueden emplear indicadores visuales o el electrodo de vidrio y de calomel que se utiliza en las titulaciones acuosas (11). Los indicadores visuales más utilizados son el cristal violeta, verde brillante, anaranjado y rojo de metilo.

El éxito de una titulación en medio no acuoso no sólo se basa en la elección adecuada del disolvente, titulante e indicador. Requiere de **extremo** cuidados y destreza por necesitar un medio anhidro, es decir, usar material perfectamente seco y solventes anhidros o con una cantidad de agua posible de eliminar o controlar y las soluciones deben protegerse de la humedad cuando se estén manejando (9),(11),(12).

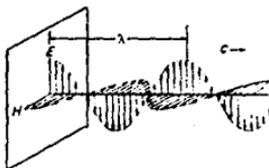
Debido a que el ácido acético fue el disolvente utilizado en el presente trabajo consultar ANEXO 1. en donde se mencionan las características del mismo.

GENERALIDADES

E S P E C T O F O T O M E T R I A

Es la interacción de la materia con la radiación electromagnética. Está representada por dos vectores perpendiculares uno al otro. Uno de los vectores corresponde al campo magnético y otro al eléctrico, considerando la dualidad de su naturaleza, como onda y como partícula (FIGURA 6); (9), (11), (17).

FIGURA 6 : PROPIEDADES ONDULATORIAS DE LA RADIACION ELECTROMAGNETICA. E: VECTOR ELÉCTRICO. M: VECTOR MAGNÉTICO. LOS DOS VECTORES SON SINUSOIDALES Y PERPENDICULARES A LA PROPAGACION DE LA ONDA.



E: vector eléctrico.
H: vector magnético.

PARAMETROS ONDULATORIOS :

λ = longitud de onda = es la distancia entre dos crestas o dos valles. Se expresa en amstrongs, milimicrones o micrones.

ν = frecuencia = número de ondas por unidad de tiempo. Se expresa en Hertz o en ciclos/seg.

Z = periodo = es el tiempo requerido para completar un ciclo. Se expresa en seg/ciclo.

Relación entre Z y ν $Z = 1/\nu$

$\bar{\nu}$ = número de onda = es el recíproco de la longitud de onda. Se expresa en cm^{-1} .

Relación entre $\bar{\nu}$ y λ $\bar{\nu} = 1/\lambda$

Cuando se hace pasar un haz de radiación electromagnética (energía) por una substancia la radiación puede ser absorbida o transmitida dependiendo de la frecuencia de la misma y de la estructura de la molécula que

atraviesa. A mayor frecuencia, menor longitud de onda y más energía. Por lo tanto tenemos (25) :

$$\Delta E = h\nu$$

ΔE = ganancia de energía en erg.
 h = constante de Plank = 6.5×10^{-27} erg.seg
 ν = frecuencia en Hz.

La energía absorbida por una molécula puede causar un incremento en las vibraciones o rotación de los átomos, o bien puede promover electrones a niveles energéticos superiores. La frecuencia particular de la radiación que puede absorber una molécula dada depende de los cambios vibracionales, rotacionales o eléctricos permitidos en dicha molécula (25). De la interacción de la molécula con una o varias regiones del espectro electromagnético y surgir un cambio en la energía electrónica o cinética de la molécula, pudiendo ser transición electrónica (atómicos y moleculares) y cinética (vibracionales o rotacionales) se puede caracterizar a la molécula (17). De tal forma, el espectro de un compuesto es un gráfico que indica cuanta radiación electromagnética se absorbe o se transmite en cada frecuencia, siendo esto altamente característico (25).

La ecuación de Lamber y Beer es la ley fundamental que rige a la absorción de todos los tipos de radiación electromagnética : $A = -abc$

Donde :

a = constante de proporcionalidad, absorbitividad.
 b = longitud interna de la celda.
 c = concentración de la solución.
 A = absorbancia, relación entre la radiación transmitida y la incidente.

Esta ecuación indica que la absorbancia de la solución es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes cuando la longitud de la trayectoria luminosa es fija (11), (16). La fracción de radiación incidente transmitida por la luz, se expresa en porcentaje :

$$- \log T = A$$

Las técnicas por espectroscopía están basadas en la capacidad que tienen los compuestos de interactuar con frecuencias de radiación características (13). La parte de la molécula que absorbe luz se denomina cromóforo (11),(9). Los grupos que no producen un incremento en la banda de absorción por sí mismos, pero que unidos a un cromóforo causan cambios tanto en la longitud de onda como en la intensidad de la banda se denominan auxocromos (17). Tanto los disolventes empleados como los radicales adyacentes a las moléculas pueden tener influencia sobre la longitud de onda y sobre la intensidad dando lugar a diferentes efectos (9). Efecto batocrómico, incremento de la longitud de onda sin variar la intensidad. Efecto hipsocrómico, disminuye la longitud de onda sin cambiar la intensidad. Efecto hiperocrómico, incrementa la intensidad de la banda sin variar la longitud de onda. Efecto hipocrómico, disminuye la intensidad sin variar la longitud de onda (9).

Actualmente, existen un gran número de instrumentos de gran sensibilidad y alcance, lo que facilita el empleo de técnicas por espectroscopía. Por eso, hoy por hoy, es una excelente herramienta de trabajo.

GENERALIDADES

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Al desarrollarse la Industria Farmacéutica en el Área de salud es explicable el por qué cada día haya mayor interés en asegurar la calidad de los productos. Para lograr esta calidad se requiere de los máximos y mejores controles dentro de la Industria.

El concepto de validación de métodos se inició a principios de 1970, con la verificación de los ensayos realizados en el laboratorio. En 1974 empezaron a aparecer documentos oficiales que avalaban dichas verificaciones, de tal forma los procedimientos para evaluar los niveles de calidad de estos productos se sujetaron a ciertos requisistos establecidos por organismos gubernamentales y oficiales de cada país (3).

Algunos organismos por su importancia a nivel internacional fueron base de estas regulaciones como la FDA (Food, Drug & Cosmetic Act), USP (The United States Pharmacopeia y el NF (National Formulary) entre otras. Las Regulaciones de las Buenas Prácticas de Manufactura (CFR) establecieron que los métodos analíticos farmacéuticos utilizados en la evaluación de los productos debían cumplir con los requisitos establecidos por USP y por la NF, es decir requieren de una validación, excepto aquellos descritos por ellos mismos, que sólo necesitan verificarse (1).

Validar un método analítico es un proceso mediante el

cual se comprueba, en el laboratorio, que cumple con los requisitos para la aplicación analítica deseada. Su objetivo es producir los mejores resultados analíticos posibles, considerando todas las variables del método (2).

Las características que requiere para su aplicación se expresan en términos de parámetros analíticos. Los más comunes son :

- a) Especificidad
- b) Exactitud
- c) Precisión
- d) Linealidad
- e) Estabilidad
- f) Reproducibilidad
- g) Límite de Detección
- h) Límite de Cuantificación
- i) Tolerancia o Robustez

Considerando la gran variedad de ensayos los requerimientos difieren. Existe un esquema de validación que clasifica las categorías que cada método necesita para su validación. La categoría I contempla a los métodos analíticos que cuantifican componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos, incluyen conservadores en producto terminado. La categoría II contempla a los métodos analíticos que determinan impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación, en producto terminado como son análisis cuantitativos y pruebas límite. La categoría III contempla a métodos analíticos que determinan las características físicas como disolución y liberación de principio activo (1).

TABLA 1 : REQUISITOS PARA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.
 Pharmacopeia Forum Current Concepts for the Validation of
 Compendial Assays. 1986 , 1241.

ELEMENTOS REQUERIDOS PARA C/CATEGORIA	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III
		cuantita tivo	límite de pba.	
PRECISION	SI	SI	NO	SI
EXACTITUD	SI	SI	*	*
LIMITE DE DETECCION	NO	NO	SI	*
LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SI	NO	*
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	*
LINEARIDAD	SI	SI	NO	*
REPRODUCIBILIDAD	SI	SI	SI	SI

* Puede ser requerido, dependiendo de la prueba específica.

Una vez establecidos los ensayos y pruebas se deben validar para garantizar los resultados y poder ser utilizados en nuevos productos o en materia prima.

A continuación se presenta una tabla que resume la validación de un método analítico, se presenta el parámetro, su definición, su determinación, su cálculo y el criterio a utilizar para evaluar los resultados de cada parámetro.

TABLA 2 - RESUMEN DE LOS PARAMETROS A EVALUAR EN LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

PARAMETRO	DEFINICION	DETERMINACION	CALCULO	CRITERIO	
PRECISION	Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una muestra homogénea. Grado de reproducibilidad de un método analítico bajo condiciones normales de operación	Análisis de muestras al 100.0 %	1/Desviación Estándar (D.E.)	Soluciones	C.V.
			2/Coefficiente de variación. $CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$ (Desviación Estándar Relativa) D.E.R.	Tabletas Cápsulas	7%
EXACTITUD	Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.	Análisis de 6 muestras preparadas por: 1/ Placebo + estándar o 2/ Adición de estándar a un 90, 100, 110% sobre la cantidad etiquetada en el producto.	1/% de recobro	1/ 97-103 %	
			2/Desviación estándar (D. E.)	2/ El 100% debe estar dentro del I.C.	
			3/Intervalo de confianza (I.C.) al 95%.	3/ $t_{exp} < t_{tab}$	
			4/1 student = 0.05% (Distribución de dos colas).		
LINEARIDAD	Es la capacidad del método para asegurar que los resultados son proporcionales a la concentración del activo dentro de un intervalo determinado.	Análisis por triplicado de muestras a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100%. La amplitud del intervalo dependerá del uso y aplicaciones del método.	1/Graficar cantidad o % adicionado vs cantidad o % recuperado	■ aprox. a 1	
			2/Calcular: Pendiente (R); Intercepto (R); Coeficiente de correlación (R); error estándar de la regresión (SE/R); Desviación estándar (R).	■ aprox. a 0	D.F. de la linealidad no debe afectar a los resultados por más de un + 1 %.
				■ aprox. 0.99	

CONTINUACION TABLA 2

PARAMETRO	DEFINICION	DETERMINACION	CALCULO	CRITERIO
LIMITE DE DETECCION	Es la minima concentraci6n del activo que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones normales de operaci6n.	1. Para m6todos instrumentales:		
		a) Determinar el nivel de ruido comparando resultados de muestras con concentraciones conocidas contra blancos y establecer el nivel detectable.	1. Se determina seg6n el m6todo instrumental	1. N.I.: Si y s6lo si la se6al es de 2 a 3 mayor que el ruido en el l6mite inferior de confianza.
		b) Medir la capacidad de correcci6n del instrumento utilizando blancos y calcular su D.F. para establecer el l6mite de detecci6n. Comprobarlo con muestras.		
		2. Para m6todos no instrumentales:		
		a) Determinar por medio del an6lisis de muestras con concentraciones.		
		b) Analizar muestras de concentraci6n conocida y establecer el nivel minimo detectable con exactitud y precisi6n.		
LIMITE DE CUANTIFICACION	Es la minima concentraci6n del activo que se puede determinar con precisi6n y exactitud aceptables, bajo las condiciones normales de operaci6n.	1. Para m6todos instrumentales:		
		a) Medir la capacidad de correcci6n del aparato utilizando blancos y calculando su D.F. para establecer el l6mite de cuantificaci6n. Posteriormente compararlo con muestras problema cerca del l6mite establecido.	Blancos para Exactitud y Precisi6n.	Blancos para Exactitud y Precisi6n.
		2. M6todos no instrumentales:		
		Analizar muestras de concentraci6n conocida y establecer el nivel minimo detectable, con exactitud y precisi6n.		

CONTINUACION TABLA 2

PARAMETRO	DEFINICION	DETERMINACION	CALCULO	CRITERIO																					
ESPECIFICIDAD	Es la medida del grado de interferencia en el análisis. Capacidad del método para obtener una respuesta debida sólo a el activo y no a otros componentes.	a) Placebo	a) Placebo	a) Placebo																					
		<p>1. Análisis de cada uno de los excipientes del producto en el método propuesto.</p> <p>2. Identificar las posibles respuestas de los excipientes.</p> <p>b) Productos de degradación:</p> <p> Someter muestras por duplicado de producto, placebo y referencia a las siguientes condiciones:</p> <p> a) 60°C / días c/3 al NEI al 100</p> <p> b) 60°C / días c/3 al de B&M 100</p> <p> c) 60°C 15 días.</p> <p> d) T.A. (Luz), 15 días</p> <p> e) T.A. (Oscuridad), 15 días.</p> <p>En caso de contar con los productos de degradación preparar muestras con placebo e productos de degradación e analizar por el método propuesto.</p> <p>c) Verificar con métodos cromatográficos (CLAR, U, CP) posibles interferencias, ya sea por excipientes o por productos de degradación.</p>	<p>No debe existir respuesta.</p> <p>b) Productos de degradación. No debe existir respuesta, en caso contrario revisar columna de criterio.</p>	<p>Si existe respuesta: OPTIMIZAR</p> <p>b) Productos Degradación. Si el método de respuesta sólo con el activo de interés es específico y se puede utilizar para estudios de estabilidad. En caso contrario debe estudiar el efecto de los productos sobre el método y optimizar.</p>																					
				<p>(ESPECIFICIDAD)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Placebo</th> <th>P.U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Solución</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cápsulas</td> <td>Ninguna</td> <td>7%</td> </tr> <tr> <td>Tabletas</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Suspensión</td> <td>7%</td> <td>7%</td> </tr> <tr> <td>Semisólido</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>CLAR</td> <td>Ninguna</td> <td>Ninguna</td> </tr> </tbody> </table>		Placebo	P.U	Solución			Cápsulas	Ninguna	7%	Tabletas			Suspensión	7%	7%	Semisólido			CLAR	Ninguna	Ninguna
	Placebo	P.U																							
Solución																									
Cápsulas	Ninguna	7%																							
Tabletas																									
Suspensión	7%	7%																							
Semisólido																									
CLAR	Ninguna	Ninguna																							

CONTINUACION TABLA 2

PARAMETRO	DEFINICION	DETERMINACION	CALCULO	CRITERIO
ESTABILIDAD	Capacidad del método para medir la respuesta inmediatamente después de preparar la muestra.	<p>Conservar la muestra a determinado tiempo bajo diferentes temperaturas:</p> <p>a) I.A. b) Refrigeración [4°C]</p> <p>Se pueden utilizar las muestras de exactitud. Análisis inicial y a las 24, 48 y 72 horas después.</p>	Igual a exactitud y precisión.	Igual a exactitud y precisión.
REPRODUCIBILIDAD	Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días en el mismo laboratorio y utilizando el mismo equipo. (Puede ser diferente laboratorio y equipo).	Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en días diferentes y cada muestra por duplicado. Se debe trabajar independientemente partiendo de una muestra homogénea del producto cercano al 100% de la concentración teórica.	Igual a exactitud y precisión.	Igual a exactitud y precisión.
TOLERANCIA O ROBUSTEZ	Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de condiciones normales de operación: diferentes temperaturas, diferentes instrumentos, diferentes marcas de reactivos, diferentes columnas, diferentes sistemas de elución, etc.	Realizar el análisis con diferentes marcas de reactivos, diferentes días diferentes analistas, diferentes instrumentos, etc.	Igual a precisión.	Igual a precisión.

EXPERIMENTACION

METODOLOGIA PROPUESTA PARA VALIDAR LOS METODOS ANALITICOS OPTIMIZADOS

El primer parámetro a revisar para una validación de un método analítico es la especificidad. Se necesita comprobar que ninguno de los excipientes interfiera en el ensayo. Para la determinación de este parámetro se necesita un lote placebo y someterlo a condiciones ambientales. Las determinaciones deben realizarse por triplicado. Si existe interferencia debe determinarse su origen y la manera de eliminarla (2),(19),(40).

Para el caso de la especificidad en productos de degradación se necesita considerar a el producto terminado, el placebo y a un estándar del activo. Se someten a diferentes condiciones y se analizan por duplicado. Las condiciones son (2),(30) :

1. A 60 °C por 7 días y con adición de 3 ml de HCl al 10 % .
2. A 60 °C por 7 días y con adición de 3 ml de NaOH al 10 % .
3. A 60 °C durante 15 días.
4. A temperatura ambiente durante 15 días y con exposición a la luz solar.
5. A temperatura ambiente durante 15 días, pero en obscuridad.

Con lo anterior se determina si el método es específico para el activo, excluyendo sus productos de degradación. En caso de no ser específico no puede ser utilizado para estudios de estabilidad, a menos que se conozcan los productos de degradación, así como su determinación. Si se desconocen los productos de degradación, se debe tratar de

estimar el efecto de los mismo sobre el método y optimizar.

El método debe ser específico para el activo, es decir ninguno de los excipientes deben interferir en la determinación, así como ningún producto de degradación debe interferir en más de un 2% (5).

El parametro de exactitud se puede determinar por dos formas. La primera es con la adición del o de los estándares a un lote placebo y la segunda es partiendo de un lote piloto o un producto terminado, es decir que contenga a los activos y añadir una cantidad conocida de estándar. La cuantificación se realiza por diferencia. El número de determinaciones es variable, ya que depende del método analítico, así como de los requisitos establecidos por la Institución o por la Compañía y de su costo entre otras cosas. Sin embargo, el número de determinaciones mínimo establecido por el IMSS y por la Secretaría de Salud es de seis (30). Se necesitan de tres diferentes concentraciones que abarquen los límites especificados para el activo. Para este caso en particular, se realizará de acuerdo a lo especificado por la norma del IMSS. Las concentraciones propuestas son del 90, 100 y 110 % porque los límites establecidos para ambos principios activos son del 75 % al 105 % . El número de determinaciones será de seis para 90 %, seis para 110 % y 15 para 100 % . Los resultados deben tratarse de acuerdo al el resumen de validación (Tabla 2. RESUMEN DE LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS). El análisis se realiza en condiciones ambientales. Los resultados.

obtenidos se comparan contra un valor T obtenido de tablas estandarizadas. El criterio a utilizar es que el 100 % debe estar dentro del intervalo de confianza y que la T experimental debe ser menor o igual a la de tablas (2) (5).

Para la precisión pueden utilizarse los mismos datos que para la exactitud. Las condiciones son ambientales y podrá realizarse para diferentes concentraciones. La precisión quedará establecida con el coeficiente de variación. Este coeficiente se calcula dividiendo la desviación estándar entre la media y multiplicando por 100. El resultado obtenido está dado en porcentaje y debe ser menor del 2% para que el método se considere preciso (2), (30), (5).

La linealidad se lleva a cabo utilizando lotes placebo con adición de estándar a diferentes concentraciones. Las condiciones son ambientales y las determinaciones se realizan por triplicado. Las concentraciones a las que se trabaja son de 80, 90, 100, 110, y 120 %. Se dibuja una gráfica del porcentaje adicionado contra el porcentaje recuperado, se calcula la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación y el error estándar de la regresión. Los resultados deben coincidir con los establecidos en la TABLA 2, (2), (5), (1), (30).

La estabilidad de la muestra se determina en un lote placebo más estándar. Para el D.2. se considera a partir de la obtención del residuo y para el D.S.G.P. cuando se lava la fase acuosa del benceno y se lleva a un matraz volumétrico de 100 ml. Estos puntos se establecieron, (véase capítulo de

Análisis de Resultados), por ser los críticos de cada uno de los activos. Partiendo de ellos la determinación de cada activo es muy diferente. Las condiciones a las que se someterán las muestras son :

1. A temperatura ambiente y exposición a la luz solar.
2. A temperatura ambiente y protegido de la luz.
3. En refrigeración.

Las determinaciones son por duplicado. La evaluación de el parámetro será utilizando el mismo que para exactitud y precisión, así como el criterio de los mismos (1),(2),(30).

Para el caso de la reproducibilidad se requieren dos analistas. Se realiza por lote placebo y adición de estándar y el número de determinaciones es de seis. Las concentraciones a considerar pueden variar del 100 %. Una tercera persona pesa la muestra de cada uno de los activos, de esta manera el analista desconoce la cantidad adicionada de estándar. La prueba se realiza entonces a "ciegas" y esto refuerza la capacidad del método, además de evitar un posible condicionamiento de los analistas. Las condiciones son ambientales. Este parámetro se evalúa igual que para exactitud (t de Student) y precisión (coeficiente de variación). El criterio es el mismo que para estos dos parámetros (1),(2),(5),(30).

Se anexa una esquematización para la validación de cada uno de los métodos analíticos propuestos para los activos, (TABLA 3), así como los métodos analíticos anteriores a la optimización.

M E T O D O S I N I C I A L E S

DICLORHIDRATO DE ZIPEPROL

(D.Z.)

En un embudo de separación de 250 ml introducir el peso de jarabe equivalente a 10 ml, de acuerdo a su densidad.

Adicionar 20 ml de agua destilada y 1 ml de carbonato de sodio al 10 %. Agitar hasta homogenización total.

Extraer la base usando 40/30/20/10/10 ml de cloroformo. Secar los extractos clorofórmicos con sulfato de sodio y filtrar. Evaporar el filtrado a sequedad.

Disolver el residuo en 50 ml de ácido acético glacial y titular con ácido perclórico 0.1 N , usando como indicador cristal violeta. Correr un blanco de ácido acético glacial.

Cada ml de ácido perclórico 0.01 N equivalen a 22.87 mg del diclorhidrato de ziperprol.

ORTO SULFAGUAYACOLATO DE POTASIO

(O.S.G.P)

Transferir un mililitro del jarabe (25 mg de OSGP) a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada. Tomar una alícuota de 5 ml y pasarla a un matraz volumétrico de 25 ml, aforar con una solución reguladora de fosfatos pH = 7. La concentración final es de 50 mcg/ml aproximadamente.

ESTANDAR :

Pesar 25.0 mg de OSGP (USP) y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. Aforar con agua destilada. Tomar una alícuota de 1 ml y llevarla a 100 ml con una solución reguladora de fosfatos pH = 7.

Leer a una longitud de onda cercana a 279 nm, usar celda de cuarzo de 1 cm y como blanco la solución reguladora de fosfatos pH = 7.

TABLA 3 : ESQUEMATIZACION DE LA VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS OPTIMIZADOS.

PARAMETRO	MUESTRA	CONDICIONES	Nº DE T	COMV
ESPECIFICIDAD	PLACEBO	AMBIENTALES	03	En caso de tener lectura revisar el método.
	PROD. DE DEGRADAC. 1. PRODUCTO 2. PLACEBO 3. ESTANDAR	a) NaOH al 10% 60°C/7 días b) HCl al 10% 60°C/7 días c) 60°C/15 días d) T.A. y luz 15 días e) T.A. y obsc. 15 días	02	
EXACTITUD	LOTE PLACEBO Y ADICION DE ESTANDAR	AMBIENTALES Concentraciones: a) 90.0 % b) 100.0 % c) 110.0 %	a) 06 b) 15 c) 06	Se puede incrementar el número de ensayos.
PRECISION	LOTE PLACEBO Y ADICION DE ESTANDAR	AMBIENTALES	a) 06 b) 15 c) 06	Se puede incrementar el número de ensayos.
LINEALIDAD	LOTE PLACEBO Y ADICION DE ESTANDAR	AMBIENTALES Concentraciones: a) 80.0 % b) 90.0 % c) 100.0 % d) 110.0 % e) 120.0 %	03	
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	LOTE PLACEBO Y ADICION DE ESTANDAR	a) DZ : GUARDAR EL RESIDUO DE LA EXTRACCION Y DEJARLO. 1. TA (LUZ) 2. TA (OBSC) 3. REFRIGERACION b) OSGP: LA FASE ACUOSA AFORADA A 100 ml CON AGUA Y DEJARLA A LAS MISMAS CONDICIONES QUE PARA DZ.	02	a) Las mtras. de T.A. mantenerlas dentro de un desecador.
REPRODUCIBILIDAD	LOTE PLACEBO Y ADICION DE ESTANDAR	AMBIENTALES	06	El analista desconoce la cantidad de estándar adicionado.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL :

- agitadores magnéticos
- bureta de 25 ml (PYREX)
- cuerpos de ebullición
- desecador
- embudos de filtración
- embudos de separación de 250 ml (PYREX)
- matraces volumétricos de 10,50 y 100 ml (PYREX)
- papel aluminio y parafilm
- pipeta graduada de 2 ml (PYREX)
- pipetas volumétricas de 5 y 10 ml (PYREX)
- vasos de precipitado de 250 ml (PYREX)

REACTIVOS .

- acético anhídrido (J.T.BAKER)
- acético glacial ácido (J.T.BAKER)
- agua destilada
- benceno
- cloroformo
- cristal violeta S.I.
- perclórico ácido 0.1 N (MERCK)
- potasio fosfato monobásico (KH₂PO₄) (J.T.BAKER)
- potasio ortosuifaguayacolato de (USP)
- sodio carbonato anhidro (J.T.BAKER)

SOLUCIONES

- carbonato de sodio al 10 %
- solución reguladora de fosfatos pH = 7 (SRF pH=7)
- solución valorada de ácido perclórico 0.01 N
- solución indicadora de cristal violeta

EQUIPO

- espectrofotómetro (BECKMAN DU-65)
- horno
- agitador eléctrico

PREPARACION DE SOLUCIONES

- * SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS pH = 7 S.R.F. pH=7
(USP XXI, 1420)

A 50 ml de una solución de fosfato de potasio monobásico 0.2 N, se le adiciona el volumen suficiente de hidróxido de sodio 0.2 N hasta obtener un pH = 7 (aproximadamente 29 ml). Llevar a 1000 ml con agua destilada.

- * SOLUCION DE FOSFATO MONDBASICO 0.2 N.

Disolver con agua destilada 27.22 g de fosfato de potasio monobásico (K_2HPO_4), llevar a 1000 ml con el mismo solvente.

- * SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 0.2 N
(USP XXI, 1432)

Partiendo de una solución de hidróxido de sodio 1 N, tomar los volúmenes adecuados hasta llegar a la concentración deseada.

- * SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 1 N
(USP XXI, 1432)

Disolver 162 g de hidróxido de sodio en 150 ml de agua destilada, enfriar la solución a temperatura ambiente y filtrar. Transferir 54.5 ml del filtrado a un matraz volumétrico de 1000 ml y llevar a volumen con agua destilada.

- * SOLUCION VALORADA DE ACIDO PERCLORICO 0.01 N EN ACIDO ACETICO GLACIAL (USP XXI, 1431)

Tomar una alícuota de 100 ml de ácido perclórico 0.1 N (MERCK) y disolverlo en 21 ml de anhídrido acético, aforar a 1000 ml con ácido acético glacial.

Estandarización: pesar aproximadamente 200 mg de biftalato de potasio, previamente secado a 120 °C por 2 hrs, disolverlo con 50 ml de ácido acético glacial neutralizado. Adicionar dos gotas de cristal violeta ST y titular con ácido perclórico 0.01N hasta que vire a verde esmeralda. Calcular la normalidad.

Cada ml de ácido perclórico 0.01 N equivalen a 20.42 mg de biftalato de potasio.

M E T O D O S :

DETERMINACION DEL DICLORHIDRATO DE ZIPEPROL (DZ)

De la muestra de jarabe pesar, de acuerdo a su densidad, lo equivalente a 40 mg de DZ y 250 mg de OSGP. Vaciarla en un embudo de separación de 250 ml. Enjuagar el matraz tres veces con 5 ml de agua destilada. Adicionar 1 ml de Na₂CO₃ al 10 % y mezclar hasta homogenización total.

Extraer la base con 25/25/25 ml de cloroformo. Recibir los extractos orgánicos en un vaso de precipitados de 250 ml. Una vez colectados adicionar cuerpos de ebullición y evaporar a sequedad. Se debe tener cuidado en no quemar la muestra.

NOTA . NO DESECHAR LA FASE ACUOSA.

Una vez seco el residuo, cubrir el vaso con papel aluminio y dejar que se enfríe la muestra en un desecador. Ya frío solubilizar con 50 ml de ácido acético glacial neutralizado.

Titular con ácido perclórico 0.01 N. Usar como indicador la solución de cristal violeta TS, hasta que vire a verde esmeralda.

Cada ml de HC104 0.01 N equivalen a 2.287 mg de DZ.

CALCULOS :

$$\text{mg DZ} / 100 \text{ ml} = \text{Vg} \times 2.287 \times \frac{\text{N del HC10 4}}{\text{N teórica del HC104}}$$

Donde :

Vg = volumen gastado de HC104

N del HC104 = normalidad obtenida

N teórica del HC10 4 = 0.01 N

DETERMINACION DEL ORTO-SULFAGUAYACOLATO DE POTASIO (OSGP)

PREPARACION DE LA MUESTRA :

Para la determinación de este principio activo se utiliza la fase acuosa remanente en el embudo de separación.

Realizar tres extracciones de 20 ml con cloroformo. Desechar los extractos orgánicos. Lavar con 25 ml de benceno la fase acuosa.

En un matraz volumétrico de 100 ml, con un embudo de filtración y algodón, recibir la fase acuosa. Lavar la fase orgánica que quedó en el embudo de separación, benceno, con agua destilada (10/5/5 ml). Recibir los lavados en el mismo matraz y llevar a volumen con agua destilada.

Tomar una alícuota de 5 ml y pasarla a un matraz volumétrico de 100 ml. Aforar con la solución reguladora de fosfatos pH = 7. De la solución anterior, tomar una alícuota de 10 ml y transferirla a un matraz de 50 ml, llevar a la marca con la solución reguladora. La concentración final aproximada es de 50 mcg/ml.

Leer al espectrofotómetro a una longitud de onda cercana a 279 nm, con una celda de 1 cm y usar como blanco la solución reguladora.

PREPARACION DEL ESTANDAR :

Pesar el equivalente a 25 mg del estándar USP del orto sulfaguayacolato de potasio y transferirlo a un matraz volumétrico de 50 ml. Disolver y aforar con la solución reguladora. Tomar una alícuota de 5 ml y llevarla a un matraz volumétrico de 50 ml. Llevar a volumen con la solución

reguladora de fosfatos.

Leer al espectrofotómetro a una longitud de onda cercana a 279 nm, con un celda de 1 cm y usar como blanco la solución reguladora.

CALCULOS :

$$\text{mg OSGP/100 ml} = \frac{\text{ABS MTA} \times \text{C} \times \text{S}}{\text{ABS STD}}$$

Donde :

ABS MTA = absorbancia de la muestra.

ABS STD = absorbancia del estándar.

C = concentración final en mcg/ml del estándar.

S = factor de dilución de la muestra y conversión de mcg a mg de la concentración del estándar.

CUIDADOS DURANTE EL ANALISIS :

- * Los dos principios activos deben determinarse el mismo día.
- * La muestra del DZ debe cubrirse con papel aluminio cuando se termine de evaporar el cloroformo y además con papel papel parafilm cuando se ponga a enfriar.
- * Debe revalorarse el ácido perclórico cada dos semanas.
- * La solución reguladora de fosfatos debe prepararse el mismo día de su uso.
- * Determinar la humedad del ácido acético cada 15 días, de acuerdo a USP XXI, pag. 1431.

RESULTADOS

DICLORHIDRATO DE ZIPEPROL

(D.Z)

TABLA 4 : PORCIENTO DE RECOBRO PARA DZ CON METODO INICIAL.

No.	% RECOBRO
1	85.38
2	74.71
3	84.60
4	84.44
5	98.05
6	85.37
7	106.71
8	84.48
9	90.11
10	87.43
11	103.25
12	90.99
13	89.03
14	86.25
15	87.63

X	89.63
S	7.9318
CV	8.90 %

TABLA 5 : PORCIENTO RECUPERADO PARA DZ CON METODO OPTIMIZADO.

No.	% RECOBRO
1	101.97
2	99.39
3	99.53
4	100.97
5	98.64

X	99.9454
S	1.2600
CV	1.2607 %

TABLA 6 : CANTIDAD DE mg REQUERIDOS DE D.Z.
DE ACUERDO AL PORCENTAJE ESTABLECIDO.

PORCENTAJE	mg D.Z.
120	48
110	44
100	40
90	36
80	34

TABLA 7 : ESPECIFICIDAD PLACEBOS PARA EL D.Z.

MUESTRA no.	ADICIONADO (mg)	RECOBRADO (mg)
1	0.0	0.0
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0

TABLA 8 : ESPECIFICIDAD PRODUCTOS DE DEGRADACION PARA D.Z.

CONDICIONES	PRODUCTO	PLACEBO	REFERENCIA
60° C 10ml HCl (10%), 7 días	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Dism vol. 97.42 %
60° C. 10ml NaOH (10%), 7 días	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Dism vol. 103.21 %
60° C. 15 días.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Dism vol. 105.49 %
45° C. 70-75 % H.R. 15 días.	98.88 %	0.0 %	100.37 %
T.A. luz. 15 días.	98.88 %	0.0 %	100.37 %
T.A. oscuridad. 15 días.	98.88 %	0.0 %	100.37 %

TABLA 9 : PORCIENTO RECUPERADO PARA UN 90 % (36 mg) DE D.Z.

no.	ADICIONADO (mg)	RECUPERADO (mg)	RECUPERADO (%)
1	36	35.99	99.96
2	36	36.1	100.28
3	36.2	36.1	99.72
4	36.1	35.76	99.69
5	36	35.87	99.65
6	36.2	36.21	100.04

PARAMETRO	RESULTADO
MEDIA	99.89 %
DESV. ESTAN.	0.2462
COEFICIENTE DE VARIACION	0.2468 %
INTERVALO DE CONFIANZA	99.63-100.15

TABLA 11 : PORCIENTO RECUPERADO PARA UN 110 % (44 mg) DE D.Z.

no.	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	44.0	43.28	98.38
2	44.0	43.51	98.87
3	44.2	43.62	98.68
4	44.3	43.73	98.72
5	44.2	43.73	98.94
6	44.3	43.96	99.23
7	44.4	44.29	99.76
8	44.1	44.11	100.01
9	43.9	44.48	101.33

PARAMETRO	VALOR OBTENIDO
MEDIA	99.324 %
DESV. ESTAND.	0.9164
COEFICIENTE DE VARIACION	0.9226 %
INTERVALO DE CONFIANZA	98.62 - 100.03

TABLA 12 : PORCIENTO RECUPERADO PARA EL 100 % DE D.Z.

No.	mg. ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	40.00	40.12	100.28
2	40.20	40.68	101.19
3	40.30	39.99	99.25
4	40.40	40.13	99.34
5	40.00	39.20	98.00
6	40.00	40.22	100.56
7	40.70	41.36	101.62
8	40.60	40.91	100.76
9	40.30	40.68	100.94
10	40.30	39.99	99.25
11	40.40	40.45	100.13
12	40.50	40.91	101.00
13	40.10	39.32	98.04
14	40.60	40.68	100.26
15	40.60	40.91	100.76

X	100.19
S	1.0966
CV	1.096 %
INT. CONF.	99.28 - 100.49

TABLA 12 : LINEARIDAD PARA D.Z.

% ADICIONADO

80.00	90.00	100.00	110.00	120.00
80.25	90.50	100.75	110.50	120.23
80.50	90.25	101.75	110.75	121.50
80.25	90.50	100.25	110.25	121.50
80.33	90.42	100.92	110.50	121.50

% RECUPERADO

80.00	90.00	100.00	110.00	120.00
80.99	89.75	99.25	108.59	123.05
81.30	89.40	101.62	108.83	122.36
79.36	90.04	101.00	110.27	120.01
81.72	89.73	100.62	109.23	121.81

REGRESION LINEAL

m	0.99776
b	0.1644
r	0.99976
r	0.99951

X	99.6353
S	1.1709
CV	1.175 %
IC	98.98-100.28

TABLA 14 : ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA D.Z.

CONDICION	DETERMINACIONES (%)			
	INICIAL	24 HRS.	48 HRS.	72 HRS.
T.A. (LUZ)	100.34	104.7	87.3	111.5
T.A. (OBSC.)	100.46	91.0	85.0	102.93
REFRIGERACION	100.34	114.25	109.81	117.71

	X	S	CV
T.A. (LUZ)	100.96	10.20	10.10 %
T.A. (OBSC.)	94.847	8.339	8.79 %
REFRIGERACION	110.527	7.522	6.81 %

TABLA 13 : RESULTADOS DE REPRODUCIBILIDAD PARA D.Z.

ANALISTA A

	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	40.3	39.91	99.04
2	40.0	39.72	99.31
3	44.0	43.13	98.02
4	42.9	43.51	101.41
5	39.9	38.96	97.64
6	40.2	40.07	99.68

X = 99.18 %	S = 1.1236	CV = 1.3609 %
-------------	------------	---------------

ANALISTA B

	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	40.6	40.68	100.20
2	40.1	39.32	98.04
3	40.5	40.91	101.00
4	40.4	40.45	100.13
5	40.3	39.998	99.26
6	40.3	40.68	100.94

X = 99.93 %	S = 1.1236	CV = 1.1244 %
-------------	------------	---------------

X	99.55 %
S	1.2412
CV	1.2467 %
IC	98.76 - 100.34

RESULTADOS

ORTOSULFAGUAYACOLATO DE POTASIO
(OSGP)

TABLA 15 : PORCIENTO DE RECOBRO PARA EL OSGP CON METODO INICIAL.

nº:	(%) RECOBRO:
1	118.91
2	122.38
3	163.12
4	110.00
5	133.45

TABLA 16 : PORCIENTO DE RECOBRO PARA EL OSGP CON METODO OPTIMIZADO.

nº:	(%) RECOBRO:
1	100.90
2	101.13
3	101.02
4	100.68
5	99.73

X	100.69
S	0.5631
CV	0.5592 %

TABLA 17 : CANTIDAD DE mg REQUERIDOS DE OSGP.
DE ACUERDO AL PORCENTAJE ESTABLECIDO.

PORCENTAJE	mg OSGP
120.0	300.0
110.0	275.0
100.0	250.0
90.0	225.0
80.0	200.0

TABLA 18 : ESPECIFICIDAD PLACEBOS PARA EL OSGP.

MUESTRA no.	ADICIONADO (mg)	RECOBRADO (mg)
1	0.0	0.0
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0

TABLA 19 : ESPECIFICIDAD PRODUCTOS DE DEGRADACION PARA OSGP.

CONDICIONES	PRODUCTO	PLACEBO	REFERENCIA
60° C 10ml HCl (10%), 7 días	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	101.52 %
60° C. 10ml NaOH (10%), 7 días	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	95.31 %
60° C. 15 días.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	Sol café. Viscosa. Dism vol.	99.31 %
45° C. 70-75 % H.R. 15 días.	102.9 %	0.0 %	98.97 %
T.A. luz. 15 días.	103.59 %	0.0 %	98.34 %
T.A. oscuridad. 15 días.	103.24 %	0.0 %	98.45 %

TABLA 20 : PORCIENTO RECUPERADO DE OSGP PARA 90 % (225.0 mg).

no.	ADICIONADO (mg)	RECUPERADO (mg)	RECUPERADO (%)
1	225.1	224.78	99.86
2	225.3	225.21	99.96
3	225.1	225.21	100.05
4	225.0	224.78	99.90
5	225.1	225.21	100.05
6	225.2	225.64	100.19

PARAMETRO	RESULTADO
MEDIA	100.0 %
DESV. ESTAN.	0.1202
COEFICIENTE DE VARIACION	0.1202 %
INTERVALO DE CONFIANZA	99.87 - 100.13

TABLA 22 : PORCIENTO RECUPERADO PARA UN 110.0 % (275.0 mg) DE OSGP.

	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	275.1	224.78	99.86
2	275.1	273.08	99.27
3	275.1	273.93	99.58
4	275.0	276.00	100.38
5	275.3	275.20	99.97
6	275.0	276.00	100.38

PARAMETRO	VALOR OBTENIDO
MEDIA	99.81 %
DESV. ESTANDAR	0.5151
COEFICIENTE DE VARIACION	0.5131 %
INTERVALO DE CONFIANZA	99.27 - 100.35

TABLA 21 : PORCIENTO RECUPERADO PARA EL 100 % DE OSGP.

Nb.	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	250.5	256.49	102.39
2	250.5	253.44	101.17
3	250.0	253.01	101.20
4	250.4	250.70	100.12
5	250.2	248.11	99.16
6	250.1	250.27	100.07
7	250.0	253.29	101.32
8	250.2	251.99	100.72
9	250.3	254.59	101.71
10	250.3	253.48	101.27
11	250.2	250.90	100.28
12	250.1	249.61	99.80
13	250.5	252.76	100.90
14	250.8	253.63	101.13
15	250.2	252.76	101.02
16	250.4	248.88	99.39
17	250.4	243.78	97.36
18	250.7	248.03	98.93

X	100.44 %
S	1.1949
CV	1.1897
IC	99.27 - 100.35

TABLA 23 : LINEARIDAD PARA OSGP.

% ADICIONADO				
80.00	90.00	100.00	110.00	120.00
80.36	90.12	100.00	110.04	120.28
80.12	90.04	101.08	110.04	121.36
80.32	90.08	100.08	110.00	121.28
80.27	90.08	100.05	110.03	121.31

% RECUPERADO				
80.00	90.00	100.00	110.00	120.00
81.02	89.96	101.32	109.20	120.82
81.10	90.04	100.28	109.20	120.82
81.06	90.17	101.02	109.97	120.72
81.06	90.06	100.87	109.97	120.78

REGRESION LINEAL	
m	1.0028
b	0.0954
r	0.9999
r	0.9999

X	100.15
S	0.7485
CV	0.7474 %
IC	99.73-100.56

TABLA 25 : ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA OSGP.

CONDICION	DETERMINACIONES (%)			
	INICIAL	24 HRS	48 HRS	72 HRS
T.A. (LUZ)	99.8	99.72	99.43	98.34
T.A. (OBSC)	100.28	100.00	99.22	98.42
REFRIGERACION	99.16	99.20	99.22	98.97

	X	S	CV	IC
T.A. (LUZ)	99.322	0.6740	0.6786 %	97.65 - 100.99
T.A. (OBSC)	99.480	0.8370	0.8413 %	97.40 - 101.56
REFRIGERACION	99.137	0.1144	0.1154 %	98.85 - 99.42

TABLA 24 : RESULTADOS DE REPRODUCIBILIDAD PARA OSGP.

ANALISTA A

	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	252.1	258.01	102.34
2	250.0	256.14	102.46
3	228.6	230.76	100.95
4	226.7	230.52	101.68
5	250.4	249.75	99.74
6	250.2	251.65	100.58

$\bar{X} = 101.29\%$ $S = 1.0626$ $CV = 1.049\%$

ANALISTA B

	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(%) RECUPERADO
1	250.20	252.76	101.02
2	250.08	253.73	101.13
3	250.05	252.76	100.90
4	250.10	249.61	99.80
5	250.20	250.90	100.28
6	250.20	248.11	99.16

$\bar{X} = 100.38\%$ $S = 0.7845$ $CV = 0.7815\%$

\bar{X}	100.83
S	1.0094
CV	1.001%
IC	100.0 - 101.5

TABLA 26 : COMPARACION DE RESULTADOS DE DZ CON LOS CRITERIOS ESTABLECIDOS:

PARAMETRO	CRITERIO	RESULTADOS	CONCLUSION
ESPECIFICIDAD a) PLACEBOS b) PRODUCTOS DE DEGRADACION	a) NO DEBE EXISTIR RESPUESTA b) NO DEBE EXISTIR RESPUESTA, EN CASO DE EXISTIR DEBE SER < 2%	a) NO HUBO RESPUESTA b) EN ALGUNOS CASOS FUE > 2 %.	a) CUMPLE b) NO CUMPLE
PRECISION	CV < 2 %	90 % = 0.25 % 100% = 1.09 % 110% = 0.92 %	CUMPLE
EXACTITUD	EL 100 % DEBE ESTAR DENTRO DEL IC.	90 % = DENTRO 100% = DENTRO 110% = DENTRO	CUMPLE
LINEARIDAD	m = 1 b = 0 r = 1 CV < 2 % 100% DENTRO IC	m = 0.9978 b = 0.1644 r = 0.9998 CV = 1.175 % 98.98 - 100.28	CUMPLE
REPRODUCIBILIDAD	CV < 2% 100 % DENTRO IC	CV = 1.247 % 98.76 - 100.34	CUMPLE
ESTABILIDAD	CUMPLIR CON CRITERIO DE PRECISION Y EXACTITUD EN 24, 48 Y 72 HRS	CV > 2 % EN TODAS LAS CONDICIONES Y DIAS	NO CUMPLE

TABLA 27 : COMPARACION DE RESULTADOS DE OSGP CON LOS CRITERIOS ESTABLECIDOS.

PARAMETRO	CRITERIO	RESULTADOS	CONCLUSION
ESPECIFICIDAD a) PLACEBOS b) PRODUCTOS DE DEGRADACION	a) NO DEBE EXISTIR RESPUESTA b) NO DEBE EXISTIR RESPUESTA, EN CASO DE EXISTIR DEBE SER < 2%	a) NO HUBO RESPUESTA b) EN ALGUNOS CASOS FUE > 2 %.	a) CUMPLE b) NO CUMPLE
PRECISION	CV < 2 %	90 % = 0.12 % 100% = 1.19 % 110% = 0.51 %	CUMPLE
EXACTITUD	EL 100 % DEBE ESTAR DENTRO DEL IC.	90 % = DENTRO 100% = DENTRO 110% = DENTRO	CUMPLE
LINEARIDAD	m = 1 b = 0 r = 1 CV < 2 % 100% DENTRO IC	m = 1.0028 b = 0.0954 r = 0.9999 CV = 0.75 % 99.73 - 100.56	CUMPLE
REPRODUGIBILIDAD	CV < 2% 100 % DENTRO IC	CV = 1.001 % 100.0 - 101.5	CUMPLE
ESTABILIDAD	CUMPLIR CON CRITERIO DE PRECISION Y EXACTITUD EN 24, 48 Y 72 HRS	CV < 2 % IC FUERA DE INTERVALO A LAS 72 HRS	CUMPLE

ANALISIS DE RESULTADOS

Después de algunos intentos fallidos para llevar a cabo la validación del método analítico se estableció un sistema útil para poder iniciar entonces la validación del mismo. Primeramente, se calificó el método por medio de unas determinaciones piloto, es decir adicionando cantidades conocidas del estandar y de los excipientes, así mismo se tomaron datos de análisis anteriores (29),(2),(30). Paralelamente, se establecieron calibraciones a los equipos con los que se iba a trabajar.

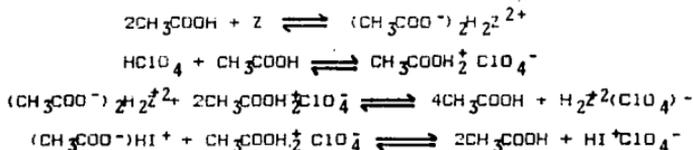
Se consideraron, para el DZ 15 determinaciones de las cuales cinco fueron obtenidas en análisis anteriores y el resto sobre lotes piloto. Los resultados obtenidos se encuentran en la TABLA 4 , en ella se observa un coeficiente de variación mucho mas alto de lo establecido en la TABLA 2 . El valor medio es inexacto.

Considerando que el zipeprol es una base débil, por la deficiencia electrónica adicional que el segundo átomo de nitrógeno ocasiona en el sistema heterocíclico (pKa 2.3) (10),(31), su determinación puede realizarse por medio de una titulación en medio no acuoso (11),(9). Actualmente, se puede determinar utilizando la cromatografía de alta presión, basada en la condensación de las dos aminas secundarias con acetaldehído, sin embargo en el laboratorio no se cuenta con este equipo (32). Siendo una base débil el disolvente a utilizar para el ensayo es el ácido acético glacial ya que

sus propiedades fuertemente ácidas incrementan las propiedades básicas de zipeprol porque su constante dieléctrica alcanza valores mas altos que en agua (11). El titulante empleado es el ácido perclórico (HClO_4) debido a que su fuerza se incrementa en el ácido acético (9). Para obtener un medio completamente anhidro y evitar algún efecto nivelador durante la titulación existen diferentes métodos para la purificación del solvente tales como destilación fraccionada, secado con pentóxido de fósforo y posteriormente una destilación, tratamientos con anhídrido acético o con permanganato de potasio. Algunos investigadores sugieren la adición de anhídrido acético equivalente al agua presente, seguido de una destilación con ácido crómico esto logra un titulante excelente (18). Sin embargo, la calidad que se requiere para la determinación del zipeprol no es tan estricta, por tanto se puede purificar utilizando el anhídrido acético en las cantidades que especifica la USP XXI (15). El ácido perclórico también purifica el ácido acético, en muy poca proporción, la cual puede incrementarse calentando suavemente al solvente (18). El ácido acético que se utilizaba para la determinación del zipeprol formaba parte de los solventes de uso continuo en el laboratorio, se determinó su humedad y se seco de acuerdo a USP XXI (15). Después de tres semanas de uso aproximado se encontraron diferencias importantes en el volumen de titulación, por lo que se determinó que se purificara cada 15 días y, se identificó para uso exclusivo en la determinación de este

activo o para cualquier titulación en medio no acuoso. Con esto se evitó su hidratación.

Para la detección del punto final se utiliza el indicador cristal violeta, llevándose a cabo los siguientes equilibrios



Para evitar los problemas que se tenían con el análisis se realizaron ajustes externos en la titulación tales como : dejar secando la muestra en el horno por 20 minutos para que los últimos mililitros de cloroformo se evaporen y prevenir de esta forma que se quemé ; cubrir el vaso de precipitados con papel aluminio antes de enfriar la muestra para evitar humedad ; cubrir con papel parafilm una vez adicionado el ácido acético neutralizado y la barra magnética.

El uso del agente desecador (Na_2SO_4) se suprimió por ser muy débil para el tipo de solvente que se está utilizando (27). Considerando que el agua es inmisible en el cloroformo es difícil la humectación del mismo. En caso de existir, el agente que se debe usar es el sulfato de magnesio (27). Además el uso de estos agentes requiere de una filtración lo que produce una pérdida importante en el análisis. Al eliminar el uso del secante se eliminó la filtración.

Se realizó un ajuste en los volúmenes de extracción siguiendo cada una de las extracciones por cromatografía en capa fina 1. El coeficiente de distribución del D.V. es de *

capa fina #. El coeficiente de distribución del D.Z. es de 12.51 (31). De tal forma se pudo comprobar que a partir del segundo volumen la totalidad del activo se encontraba extraído. Con tres extracciones se lograba un rendimiento del 99.9 % y los volúmenes de extracción fueron 25/25/20 ml con cloroformo (11).

En la cromatoplaça se encontró otra mancha que correspondía al metilparaben, ésta empezó a aparecer a partir de la tercera extracción. Este excipiente interfiere para la determinación del OSBP, por tanto se discutirá mas adelante acerca de su aparición.

Una vez establecidos los volúmenes y todos los cuidados durante la técnica se fabricó un lote placebo y se le adicionó estandar del DZ. Determinando cinco muestras como prueba piloto del método optimizado. Los resultados están expresados en porciento de recobro en la TABLA 5.

Los resultados obtenidos fueron bastante aceptables, su coeficiente de variación es menor de 1.5 % lo que indica que tiene buena precisión. Los cambios realizados en la técnica de análisis optimizaron los resultados. El método propuesto se puede validar para tener una evidencia documentada de su garantía (29).

En cuanto a los resultados obtenidos para la validación estos son aceptables. Es necesario recurrir a la TABLA 2 para recordar los valores utilizados como criterio de aceptación.

De acuerdo a los resultados para especificidad de
* INFORMACION CONFIDENCIAL DE LA CASA MATRIZ.

placebos (TABLA 7) no hay evidencia de que interfieran de manera alguna en el ensayo. El método es entonces específico para DZ.

Los resultados para los productos de degradación (TABLA 8) muestran que con el producto terminado y el placebo existen problemas de caramelización del azúcar por la temperatura tan elevada, no pudiéndose realizar el análisis. Sin embargo, en la referencia, se puede apreciar que en condiciones drásticas hay diferencias importantes en cuanto a los miligramos recuperados. Existe un decremento y un incremento en el porcentaje obtenido, mientras que cuando las condiciones no son tan severas los resultados son más lógicos y además se obtiene una buena recuperación tanto para el producto terminado como para la referencia. Los placebos no dan respuesta DZ. Siendo tan inconsistentes los resultados no se puede realizar un análisis de resultados. Se sugiere intentar su determinación por cromatografía de alta presión para ver si se nulifica la interferencia de los productos de degradación (32). Este método no es específico para productos de degradación del D.Z.

La TABLA 10 muestra los resultados de exactitud y precisión para un 100 % de DZ. Se adicionaron tres ensayos más debido a que el 100 % estaba fuera del intervalo de confianza. Los tres ensayos se realizaron retando al método, es decir que el analista desconocía la cantidad adicionada inicialmente. Los resultados para precisión y exactitud están dentro de los criterios de aceptación establecidos, el

coeficiente de variación se incrementó para 100 % . A pesar de ello, son menores al 1.5 % establecido como límite. En los tres porcentajes determinados el 100 % estuvo dentro del intervalo de confianza .

En las TABLAS 9 y 11 se muestran los resultados para un 90 y 110 % , respectivamente. Para el caso del 110 % se tuvo que hacer lo mismo que para 100 % . El 100 % está dentro del intervalo de confianza y los demás parámetros también están dentro de los criterios establecidos en la TABLA 2.

En cuanto a la linealidad del método (TABLA 12) es bastante buena, su coeficiente de correlación es muy cercano a uno, la pendiente es muy cercana a uno y la ordenada al origen a cero. Todo esto le confiere una buena capacidad de respuesta (1),(2).

La estabilidad la muestra (TABLA 14), sin embargo, no es aceptable. Se presenta un incremento considerable e inconsistencia en los resultados a partir de las 24 hrs. El análisis debe terminarse el mismo día de su inicio para poder evitar problemas de humectación, por el tipo de técnica utilizada (11). En refrigeración hay un incremento considerable de humedad y por lo tanto los resultados no son estables, aunque es lógico debido a que el medio presenta mas humedad que a temperatura ambiente. Sin embargo, a temperatura ambiente tampoco es estable , ni con luz, ni con obscuridad. Los resultados obtenidos en la obscuridad son mejores porque se guardó en un lugar seco. A las 48 hrs hubo una disminución aparente en las tres condiciones, comparado con las 24 hrs

Se sospecha de algún error analítico, ya que a las 72 hrs se vuelve a incrementar la valoración del DZ.

La reproducibilidad del método (TABLA 13) está dentro de lo especificado, pero se deben tener muchos cuidados y especificar al analista cada uno de ellos para evitar cualquier error. Los coeficientes de variación son altos, aunque no están fuera de límites, por lo tanto se sugiere una capacitación previa para familiarizar a los analistas con el método.

Para el OSGP se tomaron algunos resultados de ensayos anteriores, aunque sólo se obtuvieron unos cuantos ya que las lecturas obtenidas eran demasiado altas. Para complementar estos resultados se fabricó un lote placebo al que se le adicionó estándar y se realizó el ensayo por triplicado, de acuerdo a la técnica analítica establecida, excepto que se disminuyó la concentración para que las lecturas disminuyeran y se pudiera calcular el porcentaje de recobro (TABLA 15). Resultados tan altos hacen sospechar de una posible interferencia por parte de los excipientes de la formulación. Para determinar si existía tal interferencia se realizó un barrido en el espectro de 259 a 350 nm. Al espectro obtenido se sobrepuso el obtenido por el estándar para tener un parámetro de comparación. El espectro obtenido es la FIG. 7. Comparando los espectros se comprobó la interferencia de alguno o de varios de los excipientes del jarabe.

Para la identificación de este excipiente se preparó una solución de cada uno de los excipientes de acuerdo a la

formulación para 100 ml de jarabe y se les realizaron barridos en el espectro, bajo las mismas condiciones.

Se anexa un barrido de los excipientes, el de el azúcar refinada como ejemplo de los que no mostraron interferencia (FIG. 8). El único excipiente que mostró interferencia fue el metilparaben (FIG. 9). Este conservador es muy utilizado en la Industria Farmacéutica debido a que cumple con las propiedades de los mismos, no es muy caro; pero por ser soluble en la formulación, libre de color, olor y sabor y activo en un gran intervalo de pH's su eliminación resulta un poco más difícil (33). Los metilparabenos son sensibles a la exposición de la luz, su estabilidad química se decrementa conforme incrementa el pH y son incompatibles con excipientes alcalinos (33). Las características del metilparaben se encuentran en el anexo 2 (4). Considerando la diferencia de solubilidades en el sistema de extracción utilizado para el D.Z. y su aparición a partir de la tercera extracción en la cromatoplaca, se continuaron las extracciones con cloroformo hasta su aparición completa y desaparición, monitoreando con la misma técnica.

La USP XXI (15) presenta una técnica para determinar el OSGP como materia prima, se disuelve en una solución reguladora pH=7 y leyendo directamente al espectrofotómetro a 279 nm. Se supuso entonces que el OSGP remanente en la fase acuosa del ensayo para D.Z. ya no contenía el DZ y por lo tanto estaba mas puro, lo que representaba menos interferencias. Lo único que se necesitaba era eliminar todo

el metilparaben restante para poder leerlo al espectro. Se realizó una prueba sobre la fase acuosa siguiendo la misma técnica propuesta y se obtuvo la FIG. 10. En ella se observó que la interferencia era menor y que se obtenían mejores lecturas. De acuerdo a un estudio realizado (Girgis, et al 1984)(34), para los parabenos el espectro encontrado en una solución reguladora ácida mostró un pico máximo a 255 nm y un corrimiento de la misma en pH's menos ácidos (34). Los espectros obtenidos para este conservador eran similares, esto confirmaba su interferencia y hacía irrevocable la necesidad de su eliminación total.

Se utilizó un lote placebo y se realizaron pruebas para eliminar el metilparaben extrayendo con cloroformo y siguiendo cromatografía en capa fina la extracción. Finalmente, después de cuatro extracciones de 20 ml con cloroformo se logró eliminar el parabeno (FIG. 11). Entonces, se corrió una muestra con producto terminado y con estándar de OSGP y desapareció la interferencia (FIG. 12).

Por la densidad del cloroformo, la fase acuosa quedaba en la parte superior del embudo lo que complicaba el ensayo, entonces se propuso un último lavado con 25 ml de benceno. Con el benceno se lograban dos objetivos, eliminar por completo el metilparaben y cambiar la fase acuosa a la parte inferior del embudo. De esta manera se facilitó la obtención de la fase acuosa y permitió realizar lavados con agua al benceno para poder obtener cuantitativamente la fase acuosa. El OSGP se determinó de acuerdo a la técnica

propuesta por USP XXI para materia prima (15) y se obtuvieron buenos resultados.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante las pruebas realizadas se puede concluir que la determinación de el OSGP puede realizarse en el producto terminado utilizando la fase acuosa remanente. Al utilizar esta fase se tiene que eliminar por completo la interferencia existente del metil paraben.

Para retar la optimización se determinaron cinco muestras partiendo de un lote placebo y adicionándole cantidades conocidas de estándar del OSGP. Los resultados están en la TABLA 16. A pesar de ser muy pocos datos como para realizar un análisis estadístico, se puede observar que son bastante buenos. El porcentaje de recobro es alto y una vez eliminada la interferencia el método mostró posibilidad de una garantía documentada.

Considerando los resultados obtenidos para la especificidad de placebos y productos de degradación el método resulta específico. La determinación del producto terminado no se realizó en las condiciones mas severas por la caramelización del azúcar, sin embargo el estándar se mantuvo con buenos niveles de recuperación. En cuanto a la condición con NaOH hubo un decremento por el cambio de pH. (TABLAS 18 y 19).

Los resultados de exactitud y precisión son muy buenos, además de estar dentro de los criterios de aceptación, los porcentajes de recobro son muy altos con desviaciones estandar

y coeficientes de variación muy bajos. (TABLAS 20, 21 y 23).

Para el caso de la linealidad del método los resultados obtenidos fueron muy buenos (TABLA 23). Mostraron una excelente capacidad lineal con un coeficiente de correlación sumamente cercano a uno, una ordenada al origen de casi cero y una pendiente de casi uno. Estos datos son mejores a los obtenidos para el DZ.

La estabilidad de la muestra es aceptable hasta dos días después de su ensayo, manteniéndose en refrigeración. Si se almacena a la luz o protegida de la misma se observa un decremento en su determinación. (TABLA 25).

La reproducibilidad es mejor para este activo que para el DZ. En este caso, el analista B tenía más experiencia en el manejo de ensayos y se reflejó claramente con una desviación estándar y un coeficiente de correlación más bajos que para el analista A.

Los resultados se integraron en las TABLAS 26 y 27 en donde se puede visualizar de manera rápida y sencilla cada parámetro y concluir acerca de los mismos. Estas tablas comparan los resultados obtenidos con los criterios de aceptación establecidos. Si el resultado es congruente con el criterio establecido en la columna de RESULTADO aparecerá CUMPLE. El método analítico garantiza entonces su capacidad de cumplir con los requerimientos establecidos (1),(2),(29), (30). (TABLA 2) y se considera validado.

CONCLUSIONES

Los resultados de validación obtenidos con la optimización de los métodos garantizan la capacidad analítica de los mismos. Los métodos son específicos para excipientes, precisos, exactos, lineales y reproducibles. Los parámetros como especificidad para productos de degradación requieren de estudios posteriores para poder identificarlos y eliminarlos. Por lo tanto no son específicos para productos de degradación lo cual establece que no se pueden utilizar para estudios de estabilidad. La estabilidad del DZ no cumple con los criterios de aceptación y requiere de una determinación inmediata. El OSGP, por otra parte, es estable pero sólo durante 48 hrs. Se obtuvieron mejores resultados y se disminuyó el tiempo de análisis.

Se estableció un sistema de validación por medio del cual se pueden programar futuras validaciones partiendo de la categoría en la que esté el producto, es decir si es materia prima o producto terminado. Con este sistema se puede calendarizar y evaluar una validación conforme fácilmente, siempre y cuando se parta de métodos analíticos calificados.

Considerando que se solucionó un problema específico de un laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica, ya que los métodos analíticos establecidos son

los que ahora se utilizan para el control en proceso y producto terminado de este jarabe, además, que el sistema de validación establecido se utiliza para la programación y para los protocolos de validaciones ante la casa matriz e Instituciones Gubernamentales se concluye que este trabajo cumplió sus objetivos planteados.

ESTA COPIA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

F I G U R A S

FIGURA 7 : Espectro obtenido del estándar de OSGP (rallado) y una muestra de jarabe (en blanco), siguiendo la técnica analítica inicial. Nótese la interferencia.

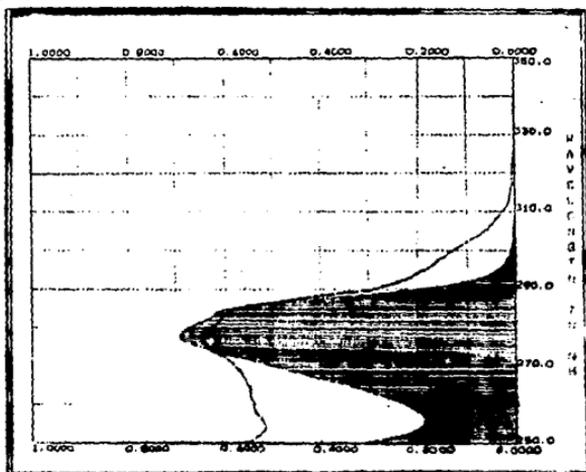


FIGURA 8 : Espectro obtenido del azúcar refinada, uno de los excipientes del jarabe. No se obtiene lectura.

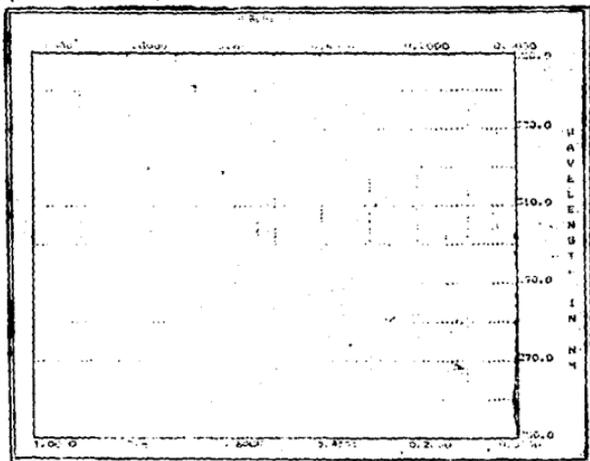


FIGURA 9 : Espectro del metilparaben. Obsérvese que da lectura a 279 nm, donde se lee el OSGP.

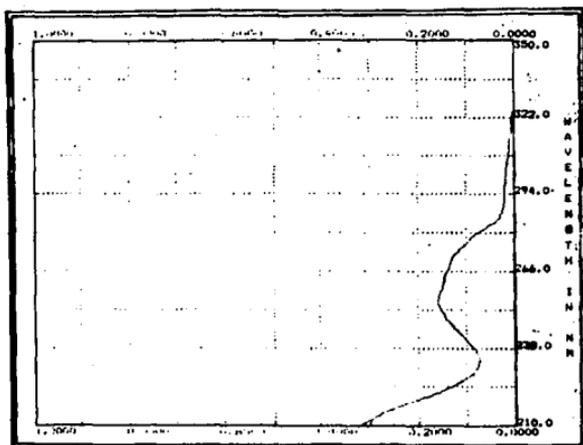


FIGURA 10 : Espectros comparativos del estándar de OSGP (rayado) y de la fase acuosa remanente en el ensayo de DZ, es decir, ya extraído el DZ y parte del metilparaben. Obsérvese la diferencia con la FIG. 7.

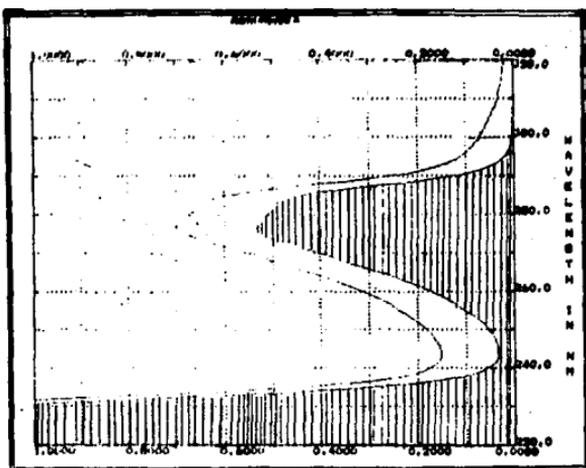


FIGURA 11 : Espectro del lote placebo en donde se observa la desaparición de la interferencia del metilparaben.

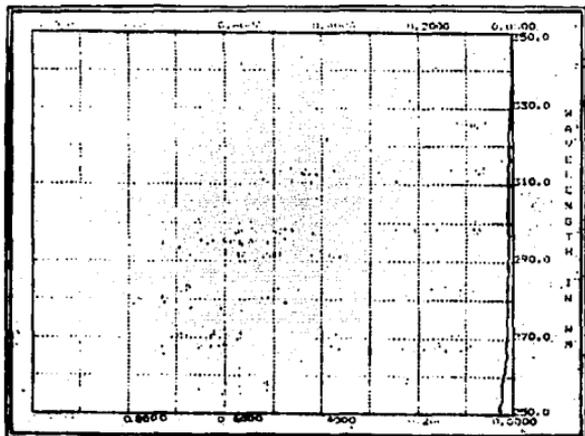


FIGURA 12 : Espectro comparativo de la muestra (en blanco) y el estándar de OSGP (rayado). Ya no existe interferencia.

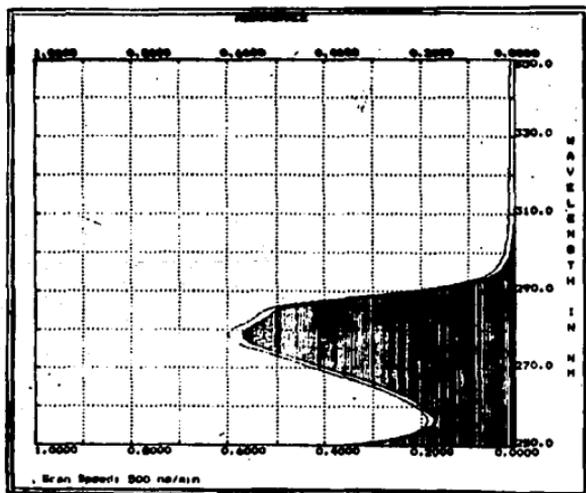
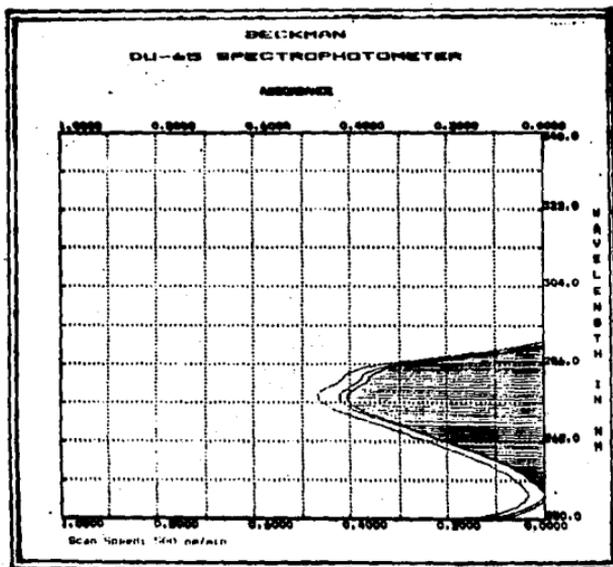


FIGURA 13 : Espectro obtenido durante la reproducibilidad del método. El estándar de OSGP está rayado y los restantes son de los dos analistas que realizaron el ensayo.

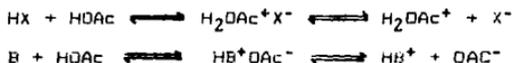


A N E X O 1

PROPIEDADES DEL ACIDO ACETICO

Es un disolvente anfiprótico, protogénico. Sus propiedades ácidas son más fuertes que las del agua. En él, los ácidos fuertes se ionizan completamente debido a que tiene una constante dieléctrica baja, por lo que se atraen formando pares iónicos de los cuales sólo una pequeña cantidad se disocia (9). Actúa como un solvente diferencial. Por otro lado, debido a su carácter protogénico permite una protonación de las bases débiles (7).

En solución tenemos :



$$K(\text{HX}) = \frac{[\text{H}_2\text{OAc}^+][\text{X}^-]}{[\text{HX}] + [\text{H}_2\text{OAc}^+\text{X}^-]} = \frac{K_1(\text{HX}) K_d(\text{HX})}{1 + K_1(\text{HX})}$$

$$K_b = \frac{[\text{BH}^+][\text{OAc}^-]}{[\text{B}] + [\text{BH}^+\text{OAc}^-]} = \frac{K_1(\text{B})K_d(\text{B})}{1 + K_1(\text{B})}$$

Para ácido muy débiles : $K_1 \gg \gg 1$

$$K(\text{HX}) = K_d(\text{HX})$$

PROPIEDADES :

Punto de ebullición	117.72 °C
Densidad (25°C)	1.0436 g/ml
Constante dieléctrica	6.194
Viscosidad (15°C)	1.314 cP

A N E X O 2

M E T I L P A R A B E N

$C_8 H_8 O_3$

PM = 152.14

Acido metil ester 4-Hidroxibenzoico. nipagin.

Agujas blancas. punto de fusión 131° C, punto de ebullición 270 - 280 °C.

Un gramo se disuelve en 400 ml de agua, 40 ml de aceite tibio, 70 ml de glicerol tibio. Muy soluble en alcohol, acetona y éter.

Usos : conservador.

(4)

Los parabenos son sensibles a una exposición excesiva de luz, su estabilidad química decrece con incremento de pH. Son atóxicos y muy efectivos a las concentraciones adecuadas, no presentan olor, sabor ni color. Bajo costo (33).

BIBLIOGRAFIA

1. Pharmacopeial Forum. "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays". USA. 1241 (1986).
2. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Colegio Nacional de QFB. A.C. "Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos". (1986).
3. Nally Joseph. Pharmaceutical Engineering. "Validation Guidelines - Industry's Perspective". May-June. 21 - 30. (1984).
4. The Merck Index. Merck and Co. Rahway, N.J. 9 th Edition.
5. Guerra. J.Pharm. Techn. "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories". Vol. I-II, 74 - 80, (1980).
6. Anal Chem. "Validation of Analytical Methods" Vol. 6, 600 A - 608 A. (1983).
7. Dick I.G. "Química Analítica". Ed. El Manual Moderno. México. 437 - 449, (1979).
8. Charlot Gaston. "Química Analítica". Ed. El Aguila. México, 141 - 143.
9. Watty Margarita . "Química Analítica". Ed. Alhambra Universidad. México, 115 - 128, (1982).
10. Paquette A.L. "Fundamentos de Química Heterocíclica". Ed. Limusa. México 1987. Capítulo 9.
11. Fritz S.J. "Química Analítica Cuantitativa". Ed. Limusa. Tercera Edición. México. (1979) , 1979.
12. Pietrzyk F. "Química Analítica". Ed. Interamericana. México. capítulo 9. (1983).
13. Stobel A.H. "Instrumentación Química". Ed. Limusa. México. (1968).
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5a. Edición. México. 1988.
15. U.S. Pharmacopeia National Formulary. XXI. National Formulary. USP XXI.
16. Skoog, West. "Análisis Instrumental". Ed. Interamericana. México. capítulos 2o. y 3o. (1983).

17. Remington. "Pharmaceutical Sciences". Merck Publishing Company, USA. 14 th Edition. Cap. 41.
18. Lagowski. "The Chemistry of Non-Aqueous Solvents". Academic Press. USA. 1970. Vol. I y II.
19. The Index Merck. 11th Edition. Merck & Co INC. USA, 1989. Pag. 6022.
20. Walter Model Editor. "Drugs of Choice". The CV Mosby Company. Saint Louis, USA, (1974).
21. Litter Manuel. "Compendio de Farmacologia". Editorial El Ateneo. Argentina, 3a. edición, (1986).
22. Collins W. "Medicinal Chemistry". Part II Wiley Interscience. 3 th. Edition. USA.
23. Farmacopea Italiana. Octava Edición. Volumen II. Pag.845.
24. Martindale."The Extra Pharmacopeia". The Pharmaceutical Press, 28 th Edition. 692. (1982).
25. Litter Manuel."Farmacologia". Ed. El Ateneo. Argentina, Capítulos 26 y 27, 856 - 874. 26 y 27.
26. Berenson, Levine. "Estadística para Administración y Economía". Ed. Interamericana. México.(1987).
27. Brewster, McEwen, Van der Werf."Curso Práctico de Química Orgánica". Ed.Alhambra. España 1982. Pag. 30 - 42.
28. Morrison and Boyd."Química Orgánica". Fondo Educativo Interamericano. Mex. 1983. Capítulo 3, pags. 422-427.
29. Chapman K.G. "A suggested validation lexicon". Pharmaceutical Technology. August (1983).Vol.7, No.8.
30. IMSS. Requisitos Mínimos para Validación de Metodos Analíticos. 1989.
31. Caccia, Fong, Urzo."Ionization constants and partition coefficients of 1-arylpiperazine derivatives". J. Pharm. Pharmacol. February (1985), 37:567-570.
32. Sidhom B.M."A new simple method for the quantitative determination of piperazine".J.Pharm.Pharmacol. March (1985). 37: 570-572.
33. Akers J.M."Considerations in selecting antimicrobial preservative agents for parenteral product development" Pharm.Techn. May (1984), Vol.8, No.5.

34. Girgis, Neqm, Mahmoud. "Application of orthogonal functions to spectrophotometric analysis of the preservatives benzalcohol, phenol, and parabens in aqueous cyanocobalamin solution". J.Pharm.Pharmacol. February (1984), 36:840-842.
35. Diccionario de Especialidades Farmaceuticas. FJH. 36a. Edicion.
36. Von Gielsdorf & Nadolny. "Zur biotransformation von Zipeprol beim Menschen". J.Clin.Chem.Biochem. Vol.19. (1981), 25-30.
37. Toyonari, Kobayashi, and Aikawa. "Zipeprol Dihydrochloride". J.Clin.Chem.Biochem. Vol.5. (1985), 42-50.
38. Puttonen Peter. "Process validation of non-sterile product forms". Rev.Mex.de Ciencias Farmaceuticas. Feb-Marzo 1990. Vol 20, No. 6, 18-25.