

63 291



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR CLAR PARA
LA CUANTIFICACION DE MALEATO DE CLORFENIRAMINA Y
CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA EN UN FORMA
FARMACEUTICA DE LIBERACION SOSTENIDA"

TESIS MANCOMUNADA

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

p r e s e n t a n

AMANDA LETICIA HERNANDEZ FLORES

MARIA CRISTINA ORTIZ NARVAEZ



MEXICO, D. F.

1 9 9 0



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	
A. CROMATOGRAFIA	3
B. MONOGRAFIAS	48
C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	80
3. PARTE EXPERIMENTAL	87
4. RESULTADOS	93
A. ESPECIFICIDAD	
B. LINEARIDAD	
C. EXACTITUD Y PRECISION DEL METODO	
D. REPRODUCIBILIDAD	
5. CONCLUSIONES	135
6. BIBLIOGRAFIA	138

1. INTRODUCCION

En nuestro país, los antigripales de liberación sostenida, presentan una gran demanda, debido a las ventajas que ofrecen; como son: eficiencia durante el tratamiento, economía, reducción de efectos colaterales (20, 21), etc.; es por ello que se detectó la necesidad de implementar un método más rápido y confiable para el análisis de estos productos.

Dentro de las diversas técnicas analíticas, la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAR) es considerada como la más rápida y confiable para la separación y cuantificación de principios activos: así como de sus productos de degradación formados durante el almacenamiento de las formas farmacéuticas.

Uno de los problemas más comunes dentro de la Industria Farmacéutica es el desarrollo y validación de métodos analíticos confiables y reproducibles que permitan asegurar la calidad de las diversas formas farmacéuticas mediante el análisis de los principios activos en el intervalo de concentración esperado, sin alteraciones debidas al sistema de medición, método empleado, analista y alteraciones del medio ambiente externo que de manera aleatoria se presentan durante el análisis.

Además, métodos que permitan monitorear su integridad mediante estudios de estabilidad.

El presente trabajo tiene como finalidad la validación de un método analítico por CLAR para la cuantificación de Maleato de clorfeniramina (MCFA) y Clorhidrato de fenilpropanolamina (CFPA) en cápsulas con microesferas de liberación sostenida; evaluando:

- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Especificidad
- Reproducibilidad

De acuerdo a los parámetros estadísticos: media (\bar{X}), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV), coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), límite de confianza (L95), pendiente (m) e intercepto (b).

2. GENERALIDADES

A. CROMATOGRAFIA (1, 5, 9, 16).

El antecedente de la cromatografía es el análisis capilar (1850).

La cromatografía como técnica de separación, fué descubierta por el botánico y químico ruso Mijail S. Tswett en 1903, quien eligió el nombre de las palabras griegas que significan "escritura en color".

La cromatografía se utilizó por primera vez en 1905 para separar mezclas de gases y vapores. Permaneció ignorada hasta 1930 cuando el investigador sueco Tiselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas: "Análisis frontal" y "Análisis por desplazamiento", las cuales ya no se usan.

En 1941 Martin y Syrige introdujeron la cromatografía de reparto para analizar cantidades muy pequeñas de aminoácidos, con lo cual obtuvieron el premio nobel de Química en 1952.

En 1968 se produjo un avance considerable en la Cromatografía Líquida, debido a la introducción de altas presiones y de sistemas de detección continua.

La cromatografía se define como un método fisicoquímico mediante el cual los componentes de una mezcla son separados selectivamente mediante la migración diferencial de los constituyentes, y posteriormente pueden ser cuantificados.

La separación se lleva a cabo mediante la distribución selectiva de los componentes de una muestra entre dos fases: una móvil y otra estacionaria; donde el tipo de interacción entre éstas y las moléculas del soluto depende de las propiedades fisicoquímicas de éste en un medio determinado.

La fase móvil fluye a través de la columna, arrastrando los componentes de la mezcla, los cuales son retenidos selectivamente por la fase estacionaria.

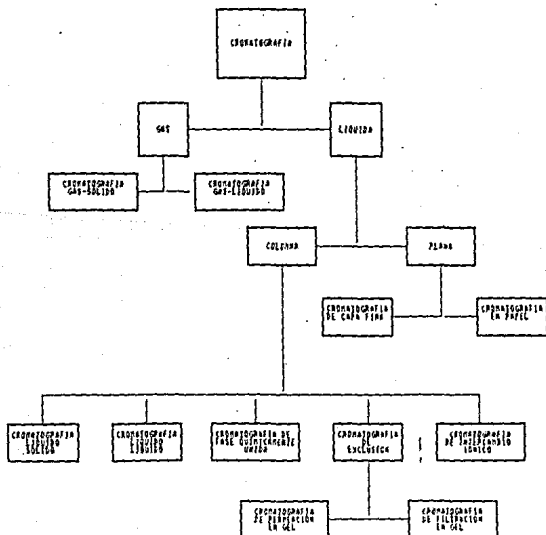
La cromatografía de líquidos, requiere que la muestra sea soluble en la fase móvil, haciendo posible el análisis de compuestos de alto peso molecular: orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes; siendo necesario encontrar la fase estacionaria adecuada para la separación selectiva de los componentes de la muestra.

TIPOS DE CROMATOGRAFIA (6).

Dependiendo del tipo de fase estacionaria o soporte en que se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla, la Cromatografía puede ser de tres tipos; basándose todos ellos en los mismos principios fundamentales:

- Cromatografía en papel
- Cromatografía en columna
- Cromatografía en capa delgada.

En base a la naturaleza de las fases involucradas, y los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en diferentes tipos:



VENTAJAS Y LIMITACIONES DE CLAR (5, 14).

VENTAJAS

Velocidad de análisis.

Alta resolución.

Automatización.

Amplio espectro de aplicación.

LIMITACIONES

Instrumentación costosa.

Método no específico para análisis cualitativo.

Experiencia indispensable.

MECANISMOS DE SEPARACION EN CROMATOGRAFIA LIQUIDA

(1, 7, 13)

A. CROMATOGRAFIA LIQUIDO - LIQUIDO (DE PARTICION).

Fu  desarrollada en Inglaterra por Martin y Syrige en 1941. Este mecanismo de distribución se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula en la fase móvil y en la fase estacionaria; de ahí que los compuestos más solubles en la fase estacionaria sean selectivamente retenidos por ella, en tanto que los menos solubles son transportados más rápidamente por la fase móvil.

La cromatografía líquido - líquido se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo peso molecular es inferior a 1500.

Las columnas más comunmente usadas son de 15 a 50cm de longitud y de 3 a 4mm de diámetro interno; la ca da de presión depende de variables tales como longitud, viscosidad de la fase móvil, temperatura, tamaño de partícula de relleno, flujo de la fase móvil; etc., pudiendo ser hasta de 35atm.

El mayor inconveniente de esta técnica es la solubilidad de la fase estacionaria en la fase móvil y el deterioro de la columna. Una forma de resolverlo es saturando la fase móvil con la fase estacionaria por medio de una precolumna que contenga un alto porcentaje de fase estacionaria.

La cromatografía líquido - líquido requiere un control cuidadoso del flujo y de la temperatura para poder identificar un compuesto determinado en función del tiempo de retención que es característico.

B. CROMATOGRAFIA DE FASE QUIMICAMENTE UNIDA.

La fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte, por lo que la fase móvil difícilmente produce deterioro en la columna.

Se pueden obtener diferentes tipos de selectividad variando la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria. Dichos grupos pueden ser de naturaleza polar o no polar. La cantidad de fase estacionaria que es posible unir a la superficie de un soporte es limitada y los tamaños de muestra separados en estas columnas son muy reducidos.

C. CROMATOGRAFIA LIQUIDO - SOLIDO.

El mecanismo de acción se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido. Algunos de los sólidos más utilizados son alúmina y gel de sílice.

Este tipo de cromatografía es muy útil y se aplica a las moléculas de baja o media polaridad, de peso molecular no mayor de 1000. Las columnas utilizadas varían entre 15 y 25cm de longitud y entre 2 y 3mm de diámetro interno.

La actividad de la superficie de muchos sólidos se ve afectada por la retención de ciertas moléculas de alta polaridad como alcoholes, fenoles, agua, etc., y debido a ello, en ocasiones es difícil reproducir los resultados obtenidos en los análisis por que las propiedades de la superficie han sufrido cambios.

En consecuencia, la superficie de la sílice empleada en cromatografía líquida de alta presión es sometida a procesos de desactivación con el propósito de disminuir la - -

retención de moléculas muy polares, y de este modo se mantiene la superficie en condiciones uniformes, lo que contribuye a mejorar en forma notable la reproducibilidad de los análisis.

D. CROMATOGRAFIA LIQUIDA POR EXCLUSION.

Se conoce también como "Cromatografía de Permeación" ó "Cromatografía de Filtración"; se efectúa la separación de acuerdo al tamaño de las moléculas.

La columna se rellena de un gel, cuyos poros son de tamaño similar al tamaño de las moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros y quedan retenidas, en tanto que las grandes no.

El intervalo de pesos moleculares en que se puede trabajar varía desde aproximadamente 500 hasta varios millones. Las columnas empleadas pueden ser muy largas (varios metros), cuando se desea separar muestras cuyos pesos moleculares están distribuidos en intervalos muy amplios.

E. CROMATOGRAFIA POR INTERCAMBIO IONICO (14, 15, 19).

Fuè usada por primera vez por Taylor y Urey, quienes separaron isótopos de Litio y Potasio. Sin embargo, el desarrollo real de este campo, empezó antes, cuando Samuelson demostró la aplicación analítica de las resinas sintéticas de intercambio iónico, comercialmente disponibles en 1940.

La primera aplicación importante de estas resinas, fuè en la separación de tierras raras e identificación de los productos de fisión del Uranio.

Las experiencias ganadas en el campo de la energía atómica se extendieron a problemas en Bioquímica; a la separación de los constituyentes del ácido nucléico y a la separación de aminoácidos.

La cromatografía de intercambio iónico, se puede considerar como una forma especial de cromatografía en la que la fase sólida contiene un material intercambiador de iones, generalmente llamado resina de intercambio iónico.

En este método, la separación se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica, por los sitios activos de la resina intercambiadora de iones.

Debido a la menor eficiencia de los materiales intercambiadores de iones, las columnas empleadas varían entre 25 y 50cm de longitud y de 3 a 4mm de diámetro interno.

Las resinas de intercambio iónico, consisten de una matriz polimérica (estireno divinil benceno), insoluble y permeable, conteniendo grupos polares ácidos o básicos que pueden ser intercambiados por iones de carga opuesta.

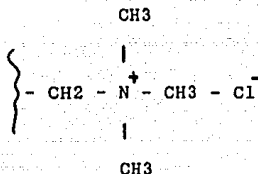
Las resinas pueden ser porosas, constituidas de partículas rígidas de copolimeros de estireno divinil benceno; peliculares, que consisten de partículas vítreas de forma esférica recubierta de una capa muy fina del copolimero en donde se encuentran los grupos activos, resinas constituidas de partículas de Zipax, en cuya superficie porosa se encuentran grupos intercambiadores de iones o resinas de materiales porosos de sílica con grupos intercambiadores químicamente unidos, los cuales resisten presiones elevadas y poseen capacidad superior de intercambio que las de materiales peliculares.

Los intercambiadores, deben ser estructuralmente estables, y las partículas deben estar empacadas de manera que haya buenas propiedades de flujo y con alta capacidad de intercambio.

TIPOS DE RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO.

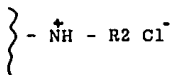
A) RESINAS DE INTERCAMBIO ANIONICO.

I. Fuertes



Aminas cuaternarias.

II. Débiles



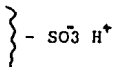
Debido a la carga neta positiva, pueden atraer e intercambiar aniones (intercambio aniónico).

Los intercambiadores aniónicos de bases débiles, adsorben aniones de soluciones de ácidos fuertes y bases moderadamente fuertes.

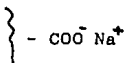
Son usadas satisfactoriamente en medios ácidos o neutros.

B) RESINAS DE INTERCAMBIO CATIONICO.

I. Fuertes.



II. Débiles.



Debido a su carga neta negativa, pueden atraer e intercambiar cationes (intercambiador catiónico).

Los intercambiadores catiónicos débiles, adsorben cationes de soluciones de bases fuertes y moderadamente fuertes. Son usados satisfactoriamente en soluciones alcalinas o neutras

La cantidad de iones contrarios móviles que una resina es capaz de enlazar, es llamada capacidad y es una medida del número de grupos funcionales disponibles en la misma; se expresa generalmente como meq/g de resina seca y es dependiente del pH.

La elección de las resinas, fuertes o débiles, de tipo aniónico o catiónico, depende en gran parte del pH en el que se realiza el intercambio y del tipo de cationes o aniones a intercambiar.

El coeficiente de selectividad indica la preferencia con que una resina de intercambio iónico fija dos o más iones de una solución.

En general, la resina fijará de preferencia iones bivalentes o multivalentes que iones monovalentes, y ante iones de la misma valencia, fijará preferentemente los más pesados.

La mayoría de las separaciones cromatográficas se llevan a cabo en soluciones acuosas, debido a las propiedades de ionización en agua.

FACTORES QUE AFECTAN LA RETENCION DE INTERCAMBIO IONICO.

- Modificaciones en el pH.
- Concentración de solución amortiguadora. A concentraciones altas, disminuye la retención.
- Temperatura. A temperaturas altas, disminuye la retención.

TERMINOS MAS USUALES EMPLEADOS EN CLAR

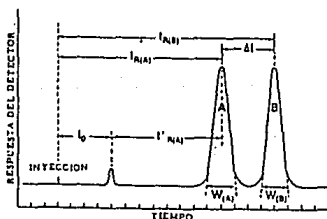
(5, 9, 13, 22, 23)

La cromatografía como técnica de separación, emplea algunos términos y símbolos característicos. A continuación se mencionan los más utilizados.

1. CROMATOGRAMA.

Registro gráfico de los componentes de una muestra, así como la concentración en que están presentes. Estos salen a un tiempo determinado de la columna, son percibidos por el detector, la señal es agrandada por un amplificador y trazada por un registrador.

(Fig. 1).



2. TIEMPO DE RETENCION (tr).

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 que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. Es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura. Generalmente se emplea como medida de tiempo cualitativo y se expresa en minutos.

El tiempo de retención puede cambiar a volumen de retención (vr), al multiplicar el caudal de la fase móvil por el tiempo de retención.

$$vr = \text{flujo (ml/min)} \times tr$$

3. TIEMPO MUERTO (to o tm).

Es el tiempo de retención de un compuesto que no es retenido.

4. TIEMPO DE RETENCION AJUSTADO (t'r).

Es la diferencia entre tr y to, es decir, la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t'r = tr - to.$$

5. ANCHURA DE LA BASE DE LAS SEÑALES (W).

Es la proporción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica; asumiendo que la forma de la señal es gaussiana.

Se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

6. NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N).

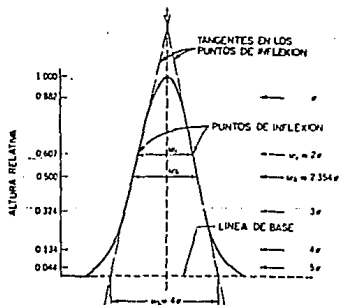
Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Existen varios métodos para cuantificar el número de platos teóricos, dependiendo de la altura a la que se tome la anchura del pico.

Considerando la anchura del pico como 4 desviaciones estándar (método de las tangentes); e incluyendo casi el 95% de la superficie o área bajo la curva, se obtiene:

$$N = 16 (tr/W)$$

Donde tr y W se expresan en las mismas unidades (tiempo, volumen, distancia, etc.), y 16 se obtiene de la consideración anterior. El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, por lo tanto, cuanto mayor sea N , más eficiente será la columna. (Fig. 2).



7. ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (AEPT).

Representa valores teóricos de las etapas de partición que sufren las moléculas de la muestra al pasar por lo largo de la columna.

AEPT representa la longitud de la columna necesaria para generar un plato teórico.

Se representa por:

$$AEPT = L / N$$

Donde:

L: Es la longitud de la columna en milímetros.

AEPT: Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra en la fase móvil y la fase estacionaria.

8. VELOCIDAD LINEAL PROMEDIO DE LA FASE MOVIL (μ).

$$\mu = L / t_0$$

Se usa cuando se representa esquemáticamente AEPT como función de μ (gráficas de Van Deemter).

9. COEFICIENTE DE DISTRIBUCION O DE REPARTO (K).

Se representa por:

Cantidad de muestra / ml de fase estacionaria.

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra / ml de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra / ml de fase móvil.}}$$

Cantidad de muestra / ml de fase móvil.

Es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y estacionaria en consideración. Es función de la temperatura.

10. RELACION DE FASES (β).

Se representa por:

$$\beta = \frac{\text{Mililitros de fase móvil}}{\text{Mililitros de fase estacionaria.}}$$

Por cada sección de columna, equivale a la proporción del volumen de dicha sección ocupado por la fase móvil y la fase estacionaria.

11. RELACION DE CAPACIDAD (K').

Es una constante termodinámica que mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de la muestra en la columna.

La fase estacionaria retarda la muestra al interaccionar con ella en un tiempo $t'r$ y el t_o es el tiempo que permanece en la fase móvil, el cociente entre ambos, da el valor de K' .

$$K' = \frac{t'r}{t_o} = \frac{\text{Tiempo en la fase estacionaria.}}{\text{Tiempo en la fase móvil.}}$$

$$K' = \frac{t_r - t_o}{t_o} = \frac{v_r - v_o}{v_o}$$

Combinando las relaciones anteriores:

$$K = K' \times \beta$$

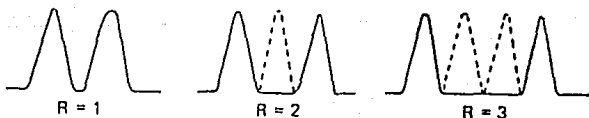
12. RESOLUCION (R).

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2} (W_1 + W_2)} = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_1 + W_2}$$

W_1 y W_2 deben ser expresados en las mismas unidades. Un valor de R igual a 1.5 significa separación completa.

(Fig. 3).



La resolución está estrechamente ligada a la selectividad, la eficiencia y el factor de capacidad.

$$R = 1/4 (\alpha - 1 / \alpha) (\sqrt{N}) (K' / 1+K')$$

13. SELECTIVIDAD (α).

En forma práctica, se puede decir que es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

Valores elevados de ésta, significan una mayor separación:

$$\alpha = t'r_2 / t'r_1$$

Puede mejorarse, por el cambio de fase móvil, el cambio de fase estacionaria y un control de la temperatura.

14. LIMITE DE DETECCION.

Es la mínima concentración de la sustancia que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.

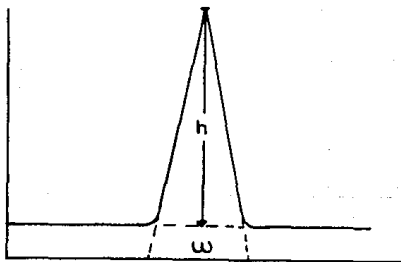
15. LIMITE DE CUANTIFICACION.

Es la mínima concentración de una sustancia que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

16. MEDIDA DEL AREA Y ALTURA DEL PICO.

La altura del pico representa la distancia vertical desde el máximo del pico, a la línea base.

Figura No. 4



W = Anchura del pico.

$A = h \times W / 2$

METODOS DE CALIBRACION (1, 7).

ESTANDAR EXTERNO.

Se emplean una serie de soluciones del compuesto de referencia, construyéndose una gráfica del área o altura del pico, contra la concentración; donde la pendiente de ésta representa el factor de respuesta y es usado para calcular la concentración del compuesto en la muestra.

ESTANDAR INTERNO.

Este método involucra la adición de un compuesto de referencia, de concentración conocida, a la muestra a analizar. Mediante este método se compensan variaciones en los parámetros de separación.

REQUISITOS:

- Debe tener un tiempo de retención cercano al pico de interés.
- Debe ser adicionado en concentración similar a la del compuesto de interés.
- Debe ser estable y de alta pureza.
- Debe ser químicamente similar al compuesto de interés.
- Debe estar ausente en la muestra a analizar.

PARTES DE UN CROMATOGRÁFO DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

(5, 13).

Un cromatógrafo de líquidos, consta de las siguientes partes:

1. INYECTOR.

- Jeringa.
- Válvulas de inyección.
- Automuestreadores.

2. PRECOLUMNA Y COLUMNA ANALÍTICA.

3. SISTEMA DE DISOLVENTES.

- Reservorios.
- Sistema de desgasificación de disolventes.
- Sistema de elución por gradiente.

4. BOMBA.

5. DETECTOR.

6. INTEGRADOR O REGISTRADOR.

INYECTOR

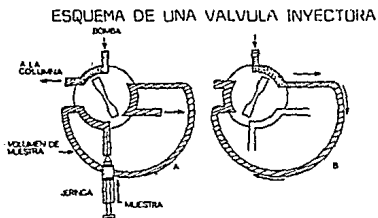
El inyector debe proporcionar una zona de poco volumen completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra y la dilución exponencial.

Debe resistir altas presiones.

En este sistema se introduce la muestra para luego ser arrastrada por la fase móvil a la columna.

Dependiendo de la presión de trabajo y del tipo de bomba usada, puede introducirse la muestra por medio de jeringas especiales, válvulas de inyección, inyectoros automáticos o por interrupción del flujo.

Figura No. 5



A. Toma de la muestra. B. Inyección de la muestra.

COLUMNA

La columna representa el corazón del sistema cromatográfico, ya que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio.

Básicamente consiste de un segmento de tubo de algún material inerte (el más usado es el acero inoxidable).

La longitud es generalmente de 10 a 50cm; con un diámetro de alrededor de 3 a 4mm. Las partículas del material de relleno tienen un diámetro de 5 a 10 μ .

Su capacidad depende de su longitud, diámetro y material de empaque. Se ha encontrado que la eficiencia es mayor cuando las paredes de la columna son muy lisas y pulidas.

La columna puede usarse a temperatura ambiente o a temperatura superior, para los fines siguientes:

- Control de proceso por separación.
- Disminución de la viscosidad de la fase móvil logrando presiones menores con aumento de transferencia de masa.
- Aumento de la solubilidad de la muestra en la fase enlazada obteniéndose una mayor eficiencia global del equipo.
- Aumento de la velocidad de migración iónica en los sistemas de intercambio iónico.

Es importante mantener un control de temperatura, debido a que en algunas columnas la eficiencia puede variar con muy pequeños cambios de temperatura ambiente.

MATERIALES PARA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Los materiales usados son resinas porosas o materiales que consisten en partículas rígidas del copolímero estireno divinil benceno, en cuya superficie y poros se encuentran los grupos intercambiadores de iones; estos materiales son de capacidad elevada proporcionando una mayor eficiencia.

Otro tipo es el intercambiador de iones pelicular o resina pelicular, que consiste de una partícula vítrea de forma esférica recubierta de una capa muy fina del copolímero.

Los grupos presentes en todo tipo de resinas de intercambio ionico suelen ser $-NR_4^+$ y $-NH_2^+$, en el caso de resinas de intercambio aniónico que se obtienen comercialmente; y en forma de cloruros. Y $-SO_3H^-$ en caso de resinas de intercambio catiónico, que se adquieren en forma de sales de sodio.

La mayoría de las resinas superficialmente porosas y resinas peliculares pueden usarse con disolventes orgánicos.

Las resinas superficialmente porosas y las peliculares no se emplean con mucha frecuencia debido a su capacidad limitada de intercambio, la cual es aproximadamente 10meq/g.

DEPOSITOS DE DISOLVENTES (RESERVORIOS).

En base al tipo de bomba, el sistema de distribución debe ser:

- De flujo constante (0.1 a 10ml/min, con no más del 2% de variación).
- Con mínimas fluctuaciones de presión.
- Con bajo nivel de interferencias.
- De simple operación.
- Químicamente inerte con la mayoría de los disolventes usados.

FASE MOVIL.

La fase móvil debe reunir las siguientes características:

- Ser compatible con la muestra.
- La muestra debe ser compatible con la fase móvil para ser transportada a través de la columna, ya que de otra manera puede haber precipitación dentro de la cámara de inyección, perdiéndose resolución en la separación.

- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Esto es de importancia en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria.
- Ser compatible con el tipo de detector usado.
- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.
- Ser de alta pureza.
- Debe tener grado espectro o grado cromatográfico para realizar el análisis con alta sensibilidad.
- Los disolventes más utilizados son: acetonitrilo, metanol, agua, tetrahidrofurano, cloroformo, cloruro de metileno, hexano, isopropanol.

BOMBA.

Su finalidad es suministrar la fase móvil a un flujo o presión controlada.

Se dividen en dos categorías: De presión constante y de flujo constante; siendo este último tipo el más común.

Dependiendo de su principio de operación se dividen en:

1. Bombas neumáticas (emplean la presión de un gas: He ó Ne).

2. Bombas mecánicas (pudiendo ser recíprocas o de desplazamiento continuo).

En CLAR, se requiere de un sistema de bombeo que proporcione altas presiones para que la fase móvil pueda ser distribuida a un flujo razonable ya que el material de relleno de la columna, constituido por partículas muy pequeñas hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea elevada.

Se debe tener en consideración:

1. Presión máxima de operación.
2. Intervalo de volúmenes obtenibles.
3. Reproducibilidad y constancia del flujo.
4. Características del flujo.
5. Resistencia a líquidos corrosivos.
6. Facilidad de limpieza.
7. Facilidad para efectuar el cambio de fase móvil.

DETECTOR

El detector proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale de la columna.

Un detector ideal, debe cumplir con los siguientes requisitos:

- Altamente sensible.
- De respuesta rápida y universal.

- Con baja desviación y nivel de ruido.
- De lectura continua.
- Estable (insensible a cambios en tipo de disolvente, velocidad de flujo y temperatura).
- De simple operación y confiabilidad.

La función del detector es medir en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la mezcla, generando una señal que sea proporcional a la concentración de muestra.

TIPOS DE DETECTORES.

Existen diferentes tipos de detectores; siendo los más usados los siguientes:

1. Detector espectrofotométrico.
2. Detector de fluorescencia.
3. Detector de índice de refracción.
4. Detector electroquímico.

1. DETECTOR ESPECTROFOTOMETRICO.

Se basa en la medida de la absorción de luz ultravioleta o visible. Debido a su alta sensibilidad, amplio rango lineal dinámico y relativa insensibilidad a la temperatura y variaciones de flujo, ha sido el más ampliamente usado. Se pueden detectar cantidades de muestra hasta del orden de 2ng.

Su principio de operación se basa en la ley de Lambert - Beer: "La fracción de radiación absorbida, es proporcional al número de especies absorbentes".

Existen diferentes tipos:

- Detector de longitud de onda simple. Emplea una línea de mercurio 254nm o 280nm.
- Detector de longitud de onda múltiple. Opera en dos longitudes de onda discretas.
- Detector de longitud de onda variable. Maximiza la sensibilidad y minimiza la absorbancia del medio circundante de la fase móvil cuando es necesario. Por lo tanto, elimina interferencias de otros compuestos con diferentes características de absorción.

Son útiles cuando puede obtenerse una mejor sensibilidad a una longitud de onda distinta de 254nm u otras para las que existen filtros.

Son útiles también cuando los distintos componentes de la muestra presentan gran absorción a diferentes longitudes de onda y por lo tanto, el empleo de una sola reduzca la sensibilidad e incluso imposibilite la detección de algunos componentes de la muestra.

Los modernos detectores de ultravioleta son capaces de trabajar a cualquier longitud de onda entre 190 y 600nm (14), operando ya sea manual o automáticamente.

Algunos detectores de ultravioleta de longitud de onda variable, cuentan con la posibilidad de efectuar registros de espectros y lecturas exactas de absorbancia a muchas longitudes de onda, mientras la muestra permanece en reposo en la celda; de esta manera se puede obtener información cualitativa superior a la simple identificación por el tiempo de retención.

Mediante la cromatografía con paro de flujo, se pueden evaluar las mejores longitudes de onda para un determinado análisis, lo cual es útil cuando no se posee información acerca de las diferentes absorptividades molares a distintas longitudes de onda, y para evaluar la pureza de los picos.

2. DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

Representa el tercer tipo de detectores más usado, debido a su alta sensibilidad (la sensibilidad de la fluorescencia es 1000 veces mayor que la del detector de ultravioleta para compuestos con absorción ultravioleta intensa), siendo por tanto mayor su especificidad.

Se basa en la absorción de luz ultravioleta por el soluto, el cual fluoresce a una longitud de onda alta.

Se emplea en compuestos que presentan fluorescencia natural o que pueden convertirse en fluorescentes por simple derivatización. Una de sus ventajas es el efectuar barridos de excitación (360nm) y emisión (400 - 700nm), para la identificación de picos a través de sus espectros.

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 a mayores longitudes de onda.

3. DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION.

Es el detector de uso corriente más universal. Su funcionamiento se basa en la medida de las diferencias en índice de refracción de los líquidos contenidos en la muestra y en la celda de referencia.

Debido a las diferencias en el índice de refracción de muchas sustancias, la sensibilidad es generalmente mayor a la obtenida por un detector de ultravioleta y fluorescencia (10^{-6} a 10^{-18} g/ml de fase móvil).

El límite de detección depende de la temperatura, del tipo de muestra y de la naturaleza de la fase móvil.

Debe reequilibrarse el detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la concentración de la fase móvil; lo cual limita el uso de elución por gradiente.

Se requiere el uso de celdas de doble paso, en las que el lado que contiene la muestra se compara constantemente con el lado de referencia que no contiene muestra.

4. DETECTOR ELECTROQUIMICO.

El uso de la electroquímica hidrodinámica en capa delgada para la detección de compuestos electroactivos en un eluyente de CLAR, es lo más reciente.

El desarrollo de estos detectores se ha fomentado, debido a la insuficiente sensibilidad para el análisis de cantidades mínimas de niveles endógenos de compuestos biológicos importantes.

Poseen un alta sensibilidad, selectividad y amplio rango de linealidad.

Pueden detectarse desde picogramos y femtogramos de compuestos electroactivos. El límite de detección determinado por la proporción de la señal al nivel de ruido, depende de la velocidad de las reacciones electroquímicas (campo Coulométrico) y de los niveles de corriente residual.

El factor de respuesta depende del coeficiente de difusión del soluto, el área del electrodo y la velocidad de flujo.

La corriente residual está determinada por la longitud de la señal y la duración del voltaje DC aplicado, variaciones de presión en el flujo, y la presencia de impurezas en el sistema de disolventes.

La reactividad electroquímica de los grupos funcionales se afecta por las variaciones de voltaje, polarización y/o composición del eluente.

Variaciones analíticas en la detección electroquímica pueden llevarse a cabo por dos técnicas diferentes:

1. VOLTAMÉTRICAS.

El voltaje CD aplicado a un electrodo varía constantemente en un periodo de tiempo y se mide la corriente resultante. Si se emplea un electrodo de gota de mercurio, el proceso se conoce como "Polarografía".

2. AMPEROMETRIA.

El potencial se lleva a un valor constante de corriente directa y se mide. Si las condiciones son controladas de tal manera que los materiales activos reaccionan con la superficie del electrodo, el proceso se denomina "Análisis Coulométrico".

REGISTRADOR.

Su función es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 a 10m .

Deben ser de respuesta rápida de pluma (sensibilidad) y velocidad variable de papel.

FORMAS FARMACEUTICAS DE ACCION PROLONGADA

(20, 21).

Para que un medicamento ejerza una acción clínica, se requiere que alcance una concentración terapéuticamente efectiva en el sitio de acción y actúe durante cierto tiempo.

En los preparados de acción sostenida, se intenta desarrollar un esquema de entrega inmediata del medicamento al organismo, de tal manera que produzca un nivel terapéuticamente efectivo que posteriormente se mantenga durante un tiempo determinado.

La introducción de estos preparados, data del año de 1952 en los E.U.A consistiendo de cápsulas denominadas "spansules" que contenían en su interior pequeños corpúsculos esféricos con recubrimiento de diferentes características.

En la actualidad existen diversas formas farmacéuticas de acción sostenida conteniendo antibióticos, hormonas, antihistamínicos, antitusivos y otros que se preparan generalmente en formas farmacéuticas de administración oral.

Este tipo de formulación se emplea en medicamentos de vida media corta y que requieren ser administrados repetidamente durante el día y la noche.

La cantidad de medicamento que se incorpora en este tipo de preparados farmacéuticos es generalmente mayor a la que se administra en una dosis simple, por lo que no se administran en esta forma medicamentos con un bajo índice terapéutico y que por lo tanto, pueden resultar peligrosos, como por ejemplo tranquilizantes, anticoagulantes, antidepresivos, etc.

VENTAJAS DE LA LIBERACION SOSTENIDA.

- Se evitan problemas por incumplimiento de los pacientes.
- Se reduce o eliminan los efectos colaterales locales y sistémicos.
- Se reduce la acumulación de principio activo en los tratamientos prolongados.
- Se reduce la potenciación o disminución de la selectividad del principio activo durante el uso prolongado.
- Se mejora la eficiencia del tratamiento.
- Resulta económico.
- Permiten la reducción de molestias gastrointestinales, facilitando la administración de principios activos agresivos.

DEFINICIONES

1. ACCION PROLONGADA.

Liberación lenta y prolongada de los principios activos, en su pasaje a través del tracto gastrointestinal.

2. ACCION RETARDADA.

El principio activo se libera en intervalos de tiempo después de su administración o hasta la existencia de ciertas condiciones fisiológicas.

3. ACCION REPETIDA.

Periodicamente se libera una dosis completa del principio activo a los flúidos gastrointestinales, siendo la velocidad de absorción igual a la de eliminación en un periodo prolongado (10 a 12hrs.).

4. LIBERACION TARDIA.

Emissiones intermitentes y repetidas del principio activo a partir de una o más unidades de liberación inmediata en una sola forma posológica.

PROPIEDADES QUE DEBEN TOMARSE EN CUENTA EN LA FORMULACION DE FORMAS FARMACEUTICAS DE LIBERACION SOSTENIDA.

1. Propiedades fisicoquímicas del principio activo (solubilidad en agua, pka).
2. Farmacocinética (vía de administración).
3. Tipo de cubierta. Puede ser:

Mezcla de ceras: Cera de abejas, de carnauba; con Monoestearato de glicerilo, Ácido esteárico, Ácido palmítico y alcohol cetílico. Se disuelven en el tracto gastrointestinal.

Gema laca: Polímeros que permanecen intactos hasta que el pH del tracto gastrointestinal se torna menos ácido.

Etil celulosa: Forma una membrana que se mantiene intacta en todo el tracto gastrointestinal; permitiendo que el agua la atraviese, disuelva al principio activo y éste difunda hacia el exterior.

Resinas acrílicas: Al igual que la etil celulosa, es un material de revestimiento para la liberación controlada del principio activo mediante difusión.

MÉTODOS PARA OBTENER UN MEDICAMENTO DE ACCIÓN PROLONGADA.

Tradicionalmente, el principio activo puede aplicarse en solución o en suspensión a la superficie de las semillas de azúcar que posteriormente se cubren con el material apropiado y se envasan en cápsulas, donde se incluye una fracción de éstas sin recubrir para obtener una liberación inmediata inicial del principio activo.

Otro método consiste en la preparación de un granulado que contiene el principio activo y que pueda esferonizarse antes del secado. Se revisten y posteriormente se fraccionan en cápsulas o se componen en tabletas.

En cualquiera de los casos anteriores, el factor limitante es el tiempo de tránsito gastrointestinal.

Durante el proceso de elaboración, se deben tener precauciones para evitar la ruptura de la cubierta en las formulaciones convencionales.

METODO DE EROSION LENTA

El principio activo se mezcla con algunas sustancias grasas no absorbentes en el tracto gastrointestinal. Este se va cediendo paulatinamente a medida que los líquidos del tracto gastrointestinal van erosionando poco a poco la masa del comprimido. La dosis inicial se encuentra en la cubierta y la de mantenimiento en el núcleo de erosión lenta.

FORMACION DE COMPLEJOS O SALES POCO SOLUBLES.

Se forman compuestos insolubles en agua con la propiedad de liberar en forma lenta el principio activo en el tracto gastrointestinal. Generalmente se emplean tanatos de algunos medicamentos.

EMPLEO DE RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO.

Se emplean por la propiedad de extraer iones de una determinada calidad, e intercambiarlos por otros unidos a la molécula de resina. Se forma un complejo de la resina con el principio activo y posteriormente se disocia en el tracto gastrointestinal con la consiguiente liberación del principio activo. El complejo formado insoluble, cede lentamente el principio activo por doble descomposición al producirse el intercambio entre el medicamento y algún ión adecuado.

EVALUACION Y CONTROLES DE PREPARADOS DE ACCION SOSTENIDA.

En los preparados farmacéuticos debe asegurarse la estabilidad del principio activo. Para asegurar, controlar y evaluar las características de los preparados, se realizan controles "in vitro" e "in vivo".

Los controles "in vitro", son útiles durante la etapa de desarrollo y permiten asegurar la uniformidad de las características del producto en los diferentes lotes de fabricación.

Los controles "in vivo", permiten controlar la cesión del medicamento en el organismo y establecer la efectividad terapéutica de los preparados.

El análisis para la determinación del número de capas del recubrimiento se lleva a cabo a diferentes valores de pH; que simulan el pasaje del principio activo desde el tracto gastrointestinal hasta la última liberación en el intestino (pH 2 a 7.2), determinándose la cantidad de principio activo liberado. Ejemplo:

ANALISIS DE UN MEDICAMENTO DE LIBERACION PROLONGADA.

1hr	20 - 39%
4hrs	50 - 85%
8hrs	≥ 95%

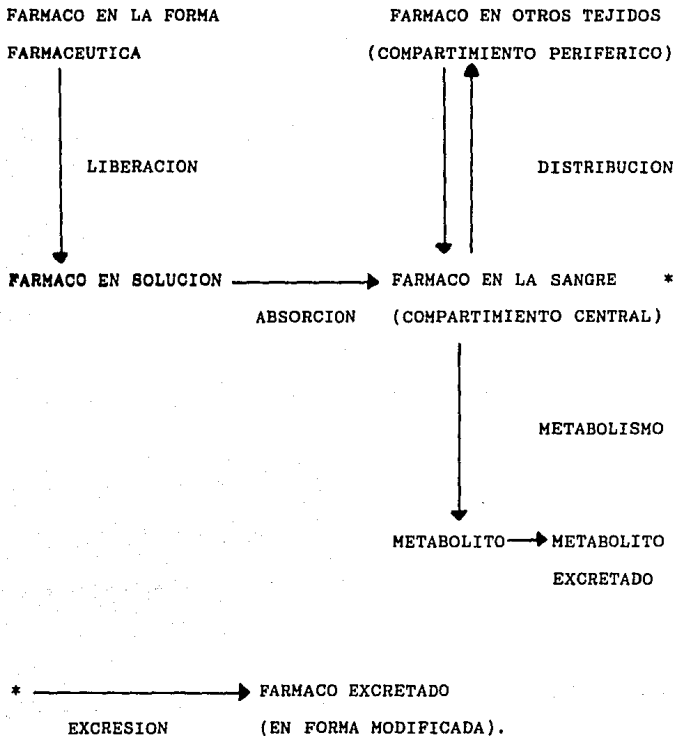


Fig. No. 6

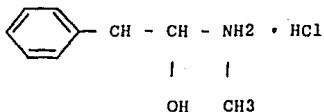
REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CURSO QUE SIGUE UN FARMACO EN EL ORGANISMO.

B. MONOGRAFÍAS.

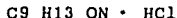
(2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 17)

CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA.

FORMULA DESARROLLADA.



FORMULA CONDENSADA.



PESO MOLECULAR.

187.67

NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS.

Clorhidrato de dl norefedrina.

Clorhidrato de α - (1 - amino etil) alcohol bencílico.

Clorhidrato de (±) - 2 - amino fenil propan - R - Ol.

Clorhidrato de 2 amino - 1 fenil - 1 - propanol.

Clorhidrato de α hidróxi - β - amino propil benceno.

Clorhidrato de 1 - fenil - 2 amino - 1 - propanol.

DESCRIPCION.

Cristales de color blanco a crema, con un ligero olor aromático.

PUNTO DE FUSION.

190 a 194°C.

ROTACION ESPECIFICA (α).

$$(\alpha)_{D}^{25} = + 32$$

\downarrow
H₂O

CONSTANTE DE DISOCIACION.

$$pka_{20^{\circ}C} = 9.4$$

SOLUBILIDAD.

Una parte es soluble en 2.5 de agua, y en 9 de alcohol. Es ligeramente soluble en isopropanol y prácticamente insoluble en cloroformo, acetato de etilo, benceno, tetracloruro de carbono, acetonitrilo, ciclohexano y éter.

IDENTIFICACION.

El espectro IR, en KBr, presenta los principales picos a las longitudes de onda de 700, 746, 1030, 1500, 1055 y 1590.

Absorción UV.

Una solución en ácido clorhídrico al 2% v/v; 1 en 2000 exhibe un máximo a aproximadamente 256nm, un mínimo a aproximadamente 262nm y un mínimo a aproximadamente 251nm.

Las absorptividades calculadas en base seca, a la longitud de onda de máxima absorción, no difieren en más de un 3% de las de una muestra estándar de referencia.

De una solución acuosa 1 en 10, adicionada de 10ml de una solución saturada de carbonato de sodio y filtrada, se obtienen cristales de fenilpropanolamina que después de secados a 80°C durante 1hr, funden entre 101 y 104°C.

Una solución acuosa al 1%, adicionada de sulfato cúprico SR, e hidróxido de sodio al 20%, desarrolla un color rojo púrpura y al agitar esta solución con éter, la capa etérea toma un color púrpura mientras que la acuosa se torna de color azul.

Una solución de clorhidrato de fenilpropanolamina, da positivas las pruebas para cloruros.

Fig. No. 7

Espectro I.R. del ClPA, obtenido en KBr.

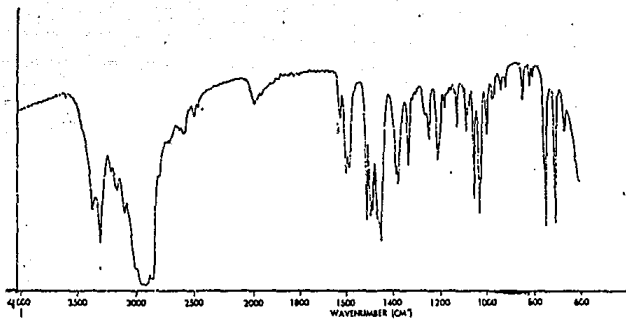


Fig. No. 8

Espectro U.V del Clorhidrato de fenilpropanolamina

Concentración: 500mcg/ml en HCl 1% v/v

Espectrofotómetro Beckman DU 50

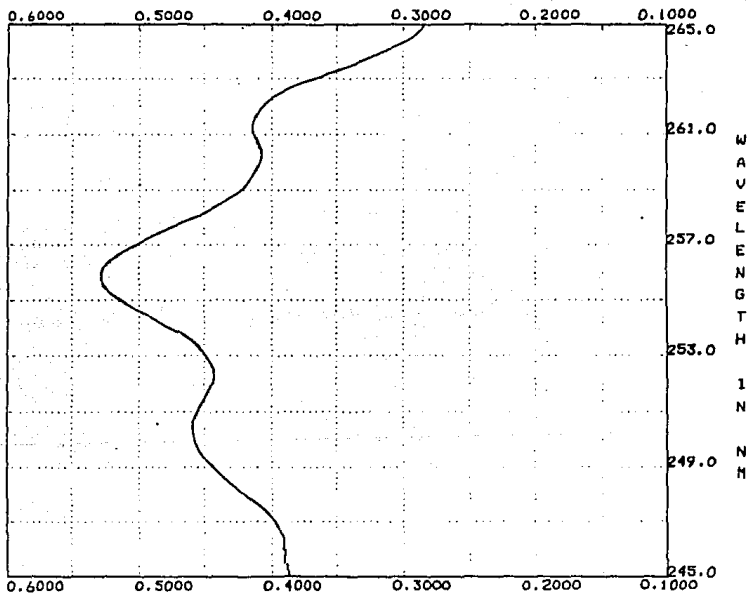
Barrido: 265 a 245nm

Velocidad: 500nm/min

BECKMAN

DU-50 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



TLC.

Soporte: Placas de sílica gel G.
Revelador: Vapores de yodo.
Fase móvil: Cloroformo / metanol (4:1).
Rf: 0.17.

pH.

Una solución acuosa al 3%, presenta un pH de 4.2 a 5.5.

HUMEDAD.

Secar 1g de muestra a 105°C durante 2hrs. No pierde más del 0.5% de su peso.

RESIDUO DE IGNICION.

La muestra no presenta más de 0.1% de residuo.

IMPUREZAS.

A. CLORHIDRATO DE α - AMINO PROPIOFENONA.

Una solución de muestra al 10% en ácido clorhídrico 0.1N, no muestra una absorción mayor a 0.662 unidades a 285nm, usando celdillas de 1cm y ácido clorhídrico 0.1N en la celda de referencia. (Equivalente a 0.1% de impureza).

Registrar el espectro de absorción de una solución estándar USP en el mismo medio, con una concentración de 100 g/ml en un espectrofotómetro adecuado de 350 a 275nm.

B. SULFATOS.

No debe encontrarse turbidez en una muestra tratada con ácido clorhídrico diluido y cloruro de bario TS.

METALES PESADOS (METODO I).

Disolver 1g de muestra en 5ml de agua, adicionar 1ml de ácido acético 1N y diluir a 25ml con agua.

Límite: No más de 20 ppm.

VALORACION NO ACUOSA (98.0 - 101.0% b.s.).

Pesar exactamente alrededor de 500mg de muestra y disolver en 50ml de ácido acético glacial. Adicionar 10ml de acetato mercurico al 6% en ácido acético, y una gota de cristal violeta TS.

Titular con ácido perclórico 0.1N hasta el punto final verde esmeralda. Efectuar una determinación en blanco, y hacer la corrección necesaria.

Cada ml de ácido perclórico 0.1N, es equivalente a 18.77mg de $C_9H_{13}ON \cdot HCl$.

VALORACION ESPECTROFOTOMETRICA (98.0 - 102.0% b.s.).

Transferir una muestra exactamente pesada de alrededor de 250mg, a un matr az volum etrico de 200ml, adicionar aproximadamente 150ml de agua destilada y 4ml de ácido clorh idrico concentrado. Disolver y llevar a volumen con agua destilada.

Registrar el espectro de absorción UV de 290 a 225nm, usando celdas de 1cm y ácido clorh idrico al 2% v/v en la celda de referencia. Correr una solución est andar en las mismas condiciones de operación.

Trazar una linea base, conectando los mínimos a 252.7 y 260.5nm y restar de la absorbancia a la longitud de onda máxima.

$$\Delta A = \text{abs. máx.} - (\text{abs. } 252.7 + \text{abs. } 260.5) / 2.$$

METODOS ALTERNATIVOS DE ANALISIS.

1. Ensayo espectrofotométrico.
2. Ensayo colorimétricos.
3. Análisis espectrofluorom trico.
4. Analisis volumétrico.
5. Cromatografía en columna.
6. Cromatografía en papel.
7. Cromatografía en capa fina.
8. Cromatografía de gases.
9. CLAR.

1. ENSAYO ESPECTROFOTOMETRICO.

La muestra es tratada con bicarbonato de sodio y metaperóxido de sodio, después de 15min, se adiciona ácido clorhídrico 1M y se extrae con hexano.

Se filtra el extracto y se determina la absorbancia a 254nm en celdas de 1cm, usando hexano en la celda de referencia.

La cantidad de productos de oxidación del clorhidrato de fenilpropanolamina (CFPA), se determina por comparación de la absorbancia de la muestra contra la de un estándar tratado en iguales condiciones.

2. ENSAYO COLORIMETRICO.

El CFPA, reacciona con ninhidrina y una solución amortiguadora de citratos a una temperatura elevada y se determina colorimétricamente a 570nm.

Se ha empleado en el análisis de CFPA en multicomponentes, en una técnica de extracción por par iónico, usando un colorante ácido (azul de bromotimol); efectuando la determinación a 420nm.

3. ANALISIS ESPECTROFLUOROMETRICO.

Se ha determinado el CFPA por medio de su derivado fluoroscaminado, 4 - fenil spiro furan - 2 (3H), 1 ftalan - 3,3 diona; a 480nm. Excitado a 398nm. La reacción se favorece a pH de 9 para una óptima reactividad.

4. ANALISIS VOLUMETRICO.

Después de la extracción del CFPA de una solución alcalina en cloroformo, se extrae con una solución estándar de cloruro de sodio y un exceso de ácido sulfúrico; el exceso de éste se titula con una solución estándar de hidróxido de sodio usando rojo de metilo como indicador.

5. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

Para la separación de CFPA de varias formas de dosificación, se usó una resina de intercambio aniónico debidamente básica (amberlita IR - 45), recobrándose un 99.6% determinado por análisis volumétrico.

Siendo una base nitrogenada, es retenida en una resina de intercambio catiónico de poliestireno sulfonado. La determinación se realiza por medida de la absorción UV después de la elución con ácido clorhídrico.

Se ha determinado también por mezcla con hidróxido de amonio; la base eluida con cloroformo de una columna de celita es determinada a 258.5nm.

6. CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

Se ha descrito un método usando papel Whatman No. 1, con un sistema de disolventes de una mezcla de butanol (saturado con ácido clorhídrico 1 M) y metanol 1:1; usando como revelador el reactivo de Dragendroff. Se observan manchas rojo-naranja determinadas cuantitativamente por densidometría.

7. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

ADSORBENTE	SISTEMA DE DISOLVENTES	Rf	REVELADOR
Gelman TLC	Benceno/acetato de etilo	0.79	p-nitrobenceno
Fibra SAF	70:30		aplicado a
			100 C
	Hexano/acetato de etilo	0.90	
	30:70		
Sílica gel G	Cloroformo/metanol	0.17	Vapores de
	4:1		yodo.

8. CROMATOGRAFIA DE GASES.

Se ha usado como método para determinar CFPA en preparaciones farmacéuticas y en fluidos corporales.

MEDICAMENTO	COLUMNA	GAS ARRANCADOR	tr	DETECTOR
Jarabe	2.4 M x 2mm vidrio pyrex 2% SE - 30 sobre Chro- mosorb W (HP).	He 180	1.8	FID
Materia prima	1.1 M x 2.5mm vidrio 18.8% Apiezon N sobre diatro- poit S.	N2 180 138 10	2.55 2.77 3.18	FID
Materia prima	1.8 M x 2mm 3% OV - 1 sobre Supel- coport 0.9m x 2mm, 3% ST - 2250 sobre Supelcoport.	N2 250	1.38	EC

9. CLAR.

Se ha usado para deteminar CFPA en formulaciones farmacéu-
ticas y en fluidos biológicos.

MEDICAMENTO	COLUMNA	FASE MOVIL	VEL.FLUJO	DETECTOR	tr
Tabletas	0.5M x 2.1mm en 36% dioxano.	0.02M (NH ₄)	1	UV	2.2
Jarabes	Du Pont 21 PA X SCX.	H ₂ O			
Jarabes	0.3M x 4mm Waters y Bondapack	0.5M KH ₂ PO ₄ H ₂ O v/v metanol.	2	254nm	0.3
Tabletas	0.25m x 4.6mm Waters Par.	2.85 x 10 ⁻² buffer etilen- diamina (pH 7.44) acetonitrilo (1:1).	3.8	216.5nm	3.8

ESTABILIDAD

Es un compuesto relativamente estable, que se altera a altas temperaturas.

FARMACOLOGIA

Es una amina simpaticomimética que actúa estimulando el sistema nervioso central, causando vasoconstricción de las membranas mucosas o bronquios, liberando norepinefrina de su sitio de almacenamiento.

Comparte propiedades farmacológicas con la efedrina con una menor estimulación del sistema nervioso central.

Presenta acciones centrales menos pronunciadas que las de las anfetaminas, estimula a los receptores α y β ; presentando usos clínicos relacionados con ambos tipos de acción.

Eleva la presión sistólica y diastólica, aumenta la fuerza de contracción miocardia y el gasto cardíaco; la circulación renal y la coronaria.

FARMACOCINETICA.

Aproximadamente el 90% es excretado sin cambio, en 24hrs. Se ha encontrado un 4% de metabolitos, principalmente como ácido pirúvico, y metabolitos n-metilados.

Es absorbido rápidamente del tracto gastrointestinal.

Tiempo de vida media en plasma: 4hrs.

Dosis: 25 a 50g cada 3 a 4hrs.

USOS.

Se emplea como broncoespasmódico, en la descongestión nasal, en ciertos desórdenes alérgicos, en la fiebre de heno, en el asma; como agente hipotensor administrado por vía intramuscular o intravenosa; en casos de rinitis y sinusitis.

TOXICIDAD.

Insomnio en medicación continua.

Dolor de cabeza.

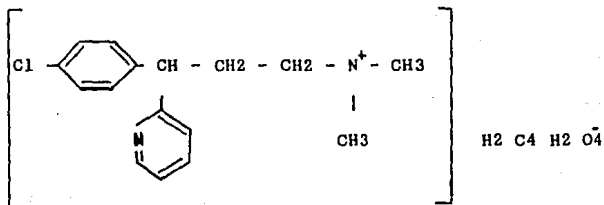
Hipertensión.

Nerviosismo.

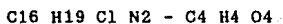
Náuseas.

MALEATO DE CLORFENIRAMINA.

FORMULA DESARROLLADA.



FORMULA CONDENSADA.



PESO MOLECULAR.

390.9

NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS.

Maleato de clorfenpiridamina.

Motril.

2 - Cp .- cloroα - 2 - (dimetilamino etil) bencil maleato de piridina.

Maleato de 1 - (4 - clorofenil) - 3 - dimetilamino 1 - (2 - piridil) propano.

Maleato de cloroprofenpiridamina.

ENSAYOS DE IDENTIDAD.

Espectro IR: En una dispersión en nujol, los picos principales se exhiben a 1585, 1086, 746, 1010, 830 y 1562nm. (Fig. No. 7).

Cromatografía en capa fina.

Soporte: Placas de sílica gel de 25mm de espesor, sumergidas o rociadas con hidróxido de potasio 0.1M en metanol, y secas.

Fase móvil: Metanol/solución de amoníaco (100:1.5); Rf:45
Ciclohexano/tolueno/dietilamina (75:15:10);
Rf: 33
Cloroformo/metanol (90:10); Rf: 18.

Reveladores: Spray Dragendorff.

Solución de yodoplatino acidificada (manchas de color violeta.

Reactivo de Marquis.

Spray ninhidrina.

Absorción UV: Una solución al 0.002% p/v en ácido sulfúrico 0.1N, en celda de 2cm, absorbe en un rango de 230 a 350nm; mostrando un máximo a 265nm. (Fig. No. 8).

DESCRIPCION.

Polvo de color blanco, cristalino e inodoro.

SOLUBILIDAD.

Soluble en 4 partes de agua, dando soluciones ácidas (pH 3 - 4).

Soluble en 10 partes de cloroformo.

Ligeramente soluble en éter y benceno.

PUNTO DE FUSION.

130 a 135°C.

pH.

Una solución acuosa al 1 % p/v en agua libre de CO₂, tiene un pH entre 4 y 5.

HUMEDAD.

1g de muestra a 105°C, durante 4hrs, no pierde más del 0.5% de su peso.

RESIDUO DE IGNICION.

1g de muestra no deja más de 0.1% de residuo.

COEFICIENTE DE PARTICION LIQUIDO - LIQUIDO.

pH _{aq.}	N-butanol	Cloroformo	N-heptano.
0.1	-	0.6	-
1.3	-	-	0.8
1.7	-	1.0	-
2.7	35.4	-	-
2.6	-	-	7.1
3.5	13.8	44.0	-
3.6	-	-	8.5
4.3	79.2	70.0	-
5.8	-	-	74.7
6.2	83.3	91.2	-
6.7	-	-	81.5
7.1	92.7	99.0	-
7.7	-	-	94.9
8.0	99.4	-	-
8.7	-	99.6	97.4
9.4	-	-	99.4
10.8	-	99.7	-
11.9	-	99.6	-
12.5	-	99.6	99.8

ENSAYOS DE IDENTIDAD.

Espectro IR: En una dispersión en nujol, los picos principales se exhiben a 1585, 1086, 746, 1010, 830 y 1562nm. (Fig. No. 7).

Cromatografía en capa fina.

Soporte: Placas de sílica gel de 25mm de espesor, sumergidas o rociadas con hidróxido de potasio 0.1M en metanol, y secas.

Fase móvil: Metanol/solución de amoniaco (100:1.5); Rf: 45
Ciclohexano/tolueno/dietilamina (75:15:10);
Rf: 33
Cloroformo/metanol (90:10); Rf: 18.

Reveladores: Spray Dragendorff.

Solución de yodoplatino acidificada (manchas de color violeta.

Reactivo de Marquis.

Spray ninhidrina.

Absorción UV: Una solución al 0.002% p/v en ácido sulfúrico 0.1N, en celda de 2cm, absorbe en un rango de 230 a 350nm; mostrando un máximo a 265nm. (Fig. No. 8).

Fig. No. 9

Espectro I.R. del MCA. obtenido en KBr.

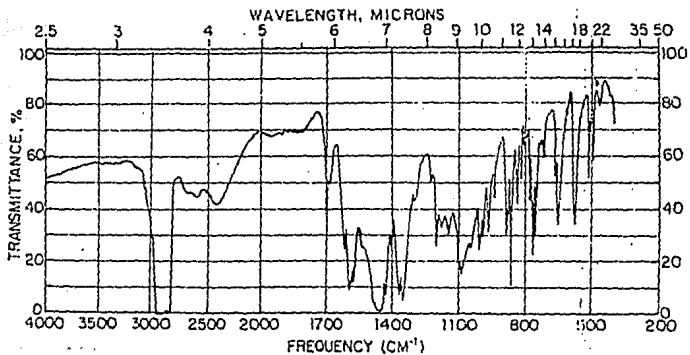


Fig. No. 10

Espectro U.V del Maleato de Clorfeniramina
Concentración: 10mcg/ml en H₂O, 2% v/v.

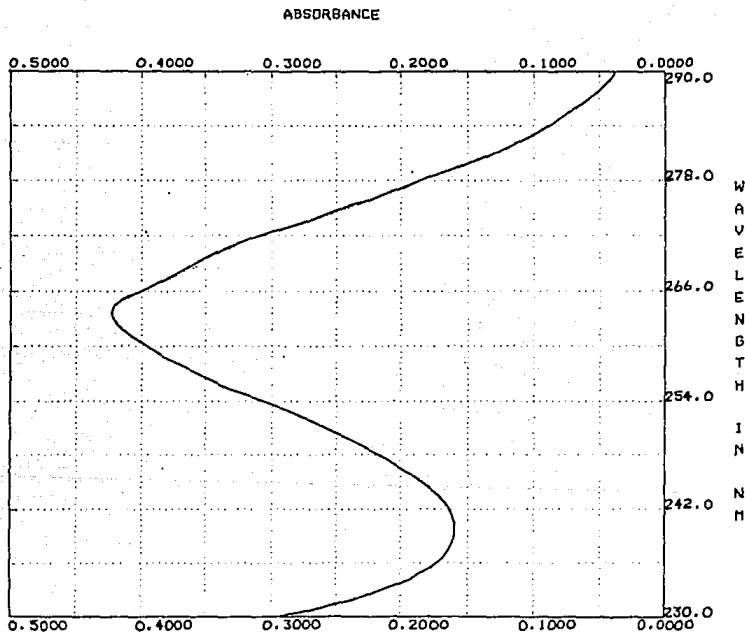
Espectrofotómetro Beckman DU 50

barrido: 290 a 230nm.

Velocidad: 500nm/min

BECKMAN

DU-50 SPECTROPHOTOMETER



DISTINCION DE CROMOGENOS DEL ACIDO SULFURICO.

25mg de muestra disueltos en 5ml de ácido sulfúrico, no muestran coloración.

SUSTANCIAS RELACIONADAS.

No más de 0.2% de cualquier impureza.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC).

Sistema cromatográfico: Placas de sílica gel G.F 25
Fase móvil: Acetato de etilo/etanol/ácido acético 1M (5:3:2).
Revelador: Yodobismutato de potasio diluído.

Preparación de las muestras.

Solución I: 1g de muestra, disuelto en 20ml de cloroformo.

Solución II: 1ml de solución I, llevado a 50ml con cloroformo.

Aplicar 2 μ l de cada solución, a 2cm de distancia de la placa.

Criterio:

Cualquier mancha diferente de la mancha principal, que aparezca en la solución II, no debe ser de mayor intensidad que la obtenida en la solución I.

CONSTANTES DE DISOCIACION (25 C).

$pka_1 = 9.2$

$pka_2 = 4.0$

ESTUDIO DE ESTABILIDAD.

Una semana a 95°C; 300mg de MCFA.

pH	% Recuperado.
2	99.0
4	95.0
6	100.0
7	97.0
8	96.0
10	96.0
13	99.0

pH/luz.

15mg/3meses/25°C

% Recuperado

pH	Luz	Obscuridad
2	101	101
4	103	101
6	102	101
8	102	100

ENSAYO.

A. VALORACION NO ACUOSA (98.0 - 100.5% b.s).

Pesar aproximadamente alrededor de 500mg de muestra, y disolver en 20ml de ácido acético glacial.

Adicionar dos gotas de cristal violeta T.S y titular con ácido perclórico 0.1N. Efectuar una titulación en blanco. Cada ml de ácido perclórico 0.1N, equivale a 19.54mg de MCFA.

B. ENSAYO ESPECTROFOTOMETRICO (99.0 - 101.0% b.s.).

Pesar exactamente alrededor de 150mg de muestra, en un matraz volumétrico de 200ml. Disolver y diluir con ácido sulfúrico 0.05M.

Diluir 1ml de esta solución a 100ml, con el mismo disolvente, mezclar y registrar el espectro de absorción UV en celdas de 1cm, de 350 a 230nm.

Registrar el espectro de una solución estándar, bajo las mismas condiciones.

C. METODOS ALTERNATIVOS DE ANALISIS.

1. Valoración ácido - base.
2. Métodos colorimétricos.
3. Métodos fluorométricos.

4. Cromatografía en capa fina.
5. Cromatografía en papel.
6. Separación por distribución en contracorriente.
7. Cromatografía gas - líquido.
8. CLAR (por intercambio iónico).
9. Polarografía.

1. VALORACION ACIDO - BASE.

Usando disolventes no acuosos, con ácido perclórico 0.1N como titulante y ácido acético como medio de valoración.

2. METODOS COLORIMETRICOS.

a) Formación de la solución de Reinecke (tetratiocianato diamín cromato III de aluminio); con posterior disolución en acetona y determinando su absorbancia.

Desventaja: Poca especificidad y descomposición del complejo por la presencia de agua.

b) Se han realizado complejaciones del MCFA con colorantes sulfon - heptaleínas, tales como el verde de bromocresol, púrpura de bromocresol o azul de bromotimol.

c) Técnicas automáticas que usan azul de bromotimol y púrpura de bromocresol para determinar selectivamente las clases polares y no polares de aminas, en una mezcla de dos tipos.

3. METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS Y FLUOROMETRICOS.

a) Técnicas analíticas de fluorescencia usando la complejación del colorante rosa de bengala.

b) Método que implica la oxidación con agua oxigenada y ataque con bromuro de cianógeno.

Ambos procesos poseen baja sensibilidad, y el método del colorante rosa de bengala muestra sensibilidad a impurezas por disolvente.

4. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

ADSORBENTE	SISTEMA DE DISOLVENTES	Rf
Sílica gel Dipped o preparada con KOH 0.1M.	Ciclohexano/benceno/dietilamina 75:15:10	0.38
Sílica gel Dipped KOH 0.1M.	Metanol	0.19

ADSORBENTE	SISTEMA DE DISOLVENTES	Rf
Sílica gel Dipped o preparada con KOH 0.1M.	Acetona	0.06
Sílica gel Merck GF	Benceno/metanol/NH4 OH 40:10:1	0.60
Sílica gel G	Acetato de etilo/metanol/NH4 OH 70:20:10	0.88

5. CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

SOPORTE	SISTEMA DE DISOLVENTES	Rf
Whatman No. 1, sumergido en acetona.	Buffer de acetatos pH 4.58, 95° C	0.69
Whatman No. 4, sumergido en HCl 0.1N en acetona.	N-butanol saturado con HCl 0.5N	0.35
Whatman 3mm impregna- do con (NH4)2 SO4 2% pH 5.3	Isobutanol/Ácido acético/agua 100:10:24	0.52

SOPORTE	SISTEMA DE DISOLVENTES	Rf
Whatman No. 1 impregnado con citrato monosódico.	N-butanol/agua/ácido cítrico 50:50:30	0.78
Whatman No. 1	N-butanol saturado con HCl 1N	0.65

6. SEPARACION POR DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE.

Onoshi, Et. Al.; separaron MCFA de algunas otras sustancias cuantitativamente, usando una distribución a contracorriente tipo "Craig"; habiendo sido necesarias 50 transferencias para una recuperación al 100%.

7. CROMATOGRAFIA DE GAS - LIQUIDO (GLC).

COLUMNA	LONGITUD DE LA COLUMNA	TEMPERATURA
SE-30 Carbowax	2m	390°C
20M /KOH	1m	230°C

COLUMNA	LONGITUD DE LA COLUMNA	TEMPERATURA
Cromo Solb W	2m	290°C
2% Carbowax 20M sobre 60/80 Cromo Solb W.	5ft	190°C
0.07% SE-30 sobre 120/170 soporte de vidrio.	6ft	175°C

8. CLAR (CROMATOGRAFIA DE PARTICION E INTERCAMBIO IONICO).

Se ha empleado para valorar MCFA en formas de dosificación y separación de antihistaminicos de los excipientes u otros principios activos.

COLUMNA	FASE MOVIL
Corasil C-18 37 - 50 μ empaque pelicular	50 - 90% acetonitrilo 50 - 10% carbonato de amonio 0.1% pH 8.5-8.9

COLUMNA

FASE MOVIL

Corasil/fenil

37 - 50 μ

Waters

60 - 80% acetonitrilo

40 - 20% acetato de

amonio 1% pH 7.4-7.6

Zipax SCX

27-37 μ

empaquete pelicular

Du Pont

0.01M - 0.04M

(NH₄)₂ HPO₄ con 32% de
dioxano en agua.

M Bondapak CN

10 μ

Waters

60% metanol

40% 0.01M (NH₄)₂ HPO₄

pH 7.5

M Bondapak fenil

10 μ empaque poroso

Waters

33% metanol

67% 0.01M acetato de

amonio pH 4.0.

Zorbax CN

5 μ empaque poroso

esférico. Du Pont.

75% acetonitrilo

25% 0.01M KH₂PO₄

La cromatografía de partición usa celita 545 y algunas columnas 25 x 200mm para la elución selectiva del MCFA.

Otro método es el uso de columnas de resina de poliestireno sulfonado, siendo el MCFA determinado subsecuentemente en forma colorimétrica.

9. POLAROGRAFIA.

El MCFA exhibe la reducción irreversible de un electrón que requiere el consumo de dos protones. (4).

El ensayo debe llevarse a cabo en ácido sulfúrico 0.2M y una concentración de muestra de 10^{-5} a 10^{-3} M.

El polarograma se concentra desde -0.4V a 0.8V. La concentración es obtenida por gráfica de la corriente de difusión (leída a -0.7V) contra varias concentraciones de estándar.

FARMACOLOGIA

Es una sal de amina terciaria, oralmente activa que nos e degrada en forma apreciable en el tracto gastrointestinal, absorbiéndose en la pared del intestino.

Antihistaminico bloqueador antagonista de la histamina, interactuando con un sitio receptor (H₁).

METABOLISMO

Después de la administración oral aparece en plasma, se une a proteínas séricas tales como albúmina y es transportada a varios tejidos.

Se encuentra en grandes concentraciones en pulmones, uñas e hígado. Se excreta normalmente sin cambio a través de la orina.

EFFECTOS SECUNDARIOS.

Sueño, sedación, intranquilidad, inestabilidad, temblor muscular, convulsiones seguidas de coma y fallo respiratorio.

APLICACIONES CLINICAS.

Se ha usado en:

- Fiebre de heno: Alergia de las vías respiratorias superiores.
- Alergias dérmicas.
- Rinitis.
- Resfriados.

C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

La validación puede definirse como el proceso por el cual, mediante estudios de laboratorio, queda establecido que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

El proceso de validación incluye la evaluación de parámetros estadísticos como son: precisión, linealidad y exactitud como medida del comportamiento del método.

PARAMETROS ESTADISTICOS A EVALUAR.

1. LINEARIDAD.

Es una medida del grado en que el comportamiento del método analítico se acerca a la linealidad, asegurando así que los resultados obtenidos directamente o mediante una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del principio activo de interés, dentro de un rango de concentraciones determinado.

A. Linearidad del sistema.

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón, usando cuando menos 5 diluciones y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución. Debe estar incluido el 100% de la dosis.

Criterio de aceptación:

$$b = 0, \quad r = 0.99, \quad r^2 = 0.98, \quad m = 1.$$

B. Linearidad del método.

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

Criterio de aceptación:

$$b = 0, \quad m = 1, \quad r = 0.99, \quad r^2 = 0.98, \quad CV = 2\%$$

2. EXACTITUD AL 100%.

Se define como la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se analizan al menos 6 placebos adicionados del 100% del principio activo de manera independiente.

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2\%$$

3. PRECISION DEL SISTEMA Y DEL METODO.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

Es una medida de la reproducibilidad y/o repetibilidad, y se expresa en términos de la desviación estándar o del coeficiente de variación.

A. Repetibilidad.

Se define como la precisión de un método analítico, expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes.

B. Reproducibilidad.

Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días y/o laboratorios; analizando por triplicado cada muestra, utilizando los mismos y/o diferentes equipos. Debe trabajarse de manera independiente, partiendo de una muestra homogénea del producto, cercana al 100% de lo declarado en el marbete

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2\%$$

C. Precisión del sistema.

Se determina mediante el análisis por sextuplicado de una misma solución estándar, correspondiente al 100%.

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 1.5\%$$

4. ESPECIFICIDAD.

Es la medida del grado de interferencia en el análisis de mezclas complejas.

Es la sensibilidad del método para obtener una respuesta debida únicamente al principio activo de interés y no a otros componentes de la muestra.

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

Para efectos de métodos indicadores de estabilidad, debe verificarse que cada producto de degradación puede ser separado de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

FORMULAS ESTADISTICAS EMPLEADAS.

1. Desviación estándar (DE).

$$DE = \sqrt{(X - \bar{X})^2 / n-1}$$

2. Coeficiente de variación (CV).

$$CV = DE \times 100 / \bar{X}$$

3. Error estándar (E).

$$E = DE / \sqrt{n}$$

4. Media (\bar{X}).

$$\bar{X} = (X) / n$$

5. Coeficiente de correlación (r).

$$r = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{\sqrt{[n \sum X^2 - (\sum X)^2] [n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

6. Limite de confianza (L95%).

$$L95\% = \bar{X} \pm t \text{ DE} / \sqrt{n}$$

7. Pendiente (m).

$$m = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

8. Intercepto (b).

$$b = Y - mX$$

9. Error estándar de regresión (Sy/x).

$$S_{y/x} = [n \sum (Y - \bar{Y})^2 / n - 2]^{1/2}$$

10. Coeficiente de determinación (r²).

$$r^2 = \frac{(n \sum XY - \sum X \sum Y)^2}{[n \sum X^2 - (\sum X)^2] [n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}$$

3. PARTE EXPERIMENTAL

(21)

El trabajo experimental se realizó en cápsulas conteniendo microsferas de liberación prolongada; con la siguiente formulación:

Clorhidrato de fenilpropanolamina	50mg
Maleato de clorfeniramina	8mg
Excipiente c.b.p.	400mg

EQUIPO

Cromatógrafo de líquidos Beckman modelo System Gold 116, equipado con detector de longitud de onda variable modelo 166, bomba de alta presión e impresora de datos.

Baño de ultrasonido Brasonic.

Equipo de filtración Millipore.

Membranas Millipore tipos GV y HA para filtrar disolventes orgánicos y acuosos respectivamente.

REACTIVOS.

Metanol grado CLAR.

Sulfato de amonio RA al 1%.

Acido sulfúrico al 1% v/v.

Metanol RA / agua destilada (50:50).

A. DETERMINACION CUANTITATIVA DE GFPA Y MCFA EN MICROESFERAS DE LIBERACION SOSTENIDA.

FASE MOVIL.

Metanol (grado CLAR) / sulfato de amonio RA 1% (pH 7.0 0.05, ajustado con una solución al 10% v/v de hidróxido de amonio); 85:15.

Filtrar a través de membrana Millipore GV de 0.22 o equivalente.

Desgasificar durante 10min en un equipo de ultrasonido.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

EQUIPO:	Cromatógrafo de líquidos Beckman (System Gold)
COLUMNA:	Ultrasil SCX de 25cm x 4.6mm.
DETECTOR:	UV a 254nm.
FLUJO:	2ml/min.
PRESION:	Aproximadamente 1500psi.
TEMPERATURA:	Ambiente.
SENSIBILIDAD:	0.02 U.A.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

VOLUMEN INYECTADO: 20 μ l.
ATENUACION: 32 Aups.
VELOCIDAD DE LA
CARTA: 0.25cm/min.

TIEMPOS DE RETENCION APROXIMADOS

Clorhidrato de fenilpropanolamina	2.8min
Clorhidrato de difenhidramina (std. int.)	5.0min
Maleato de clorfeniramina	6.6min

PREPARACION

SOLUCION ESTANDAR.

Pesar exactamente alrededor de 130mg de estándar de referencia de CFPA y 20mg de estándar de referencia de MCFA; transferirlos cuantitativamente a un matr az volum etrico de 50ml, disolver y llevar a volumen con ácido sulf urico 1% v/v.

De esta solución, transferir cuantitativamente 5ml a un matríz volumétrico de 50ml, adicionar con pipeta volumétrica dos ml de la solución del estándar interno y llevar a volumen con metanol RA/agua 50:50.

Filtrar la solución a través de una membrana GV de 0.22 o equivalente.

SOLUCION ESTANDAR INTERNO.

Pesar exactamente alrededor de 300mg de clorhidrato de difenhidramina, transferirlos a un matríz volumétrico de 50ml, disolver y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración aproximada de 6mg/ml).

SOLUCION MUESTRA.

Pesar exactamente alrededor de 1g de la muestra homogénea mediante el "rifileado"* de la misma, y transferirla a un matríz volumétrico de 50ml. Disolver y diluír con ácido sulfúrico al 1% v/v. Filtrar a través de papel Whatman No.42, descartando los primeros 15ml del filtrado. Transferir cuantitativamente una alícuota de 5ml a un matríz volumétrico de 50ml, adicionando volumétricamente 2ml de la solución del estándar interno y llevar a volumen con metanol RA/agua 50:50. Filtrar a través de una membrana GV de 0.22 o equivalente.

* Mezclado homogéneo de las microesferas.

PROCEDIMIENTO.

Inyectar la solución estándar y muestra las veces necesarias para que la relación de áreas del pico de interés y la del estándar interno, entre muestra y muestra, no sea mayor al 2%. Posteriormente, inyectar el estándar y las muestras por triplicado.

CALCULOS.

$$\%CFPA = \frac{R \text{ muestra} \times \%V \times W \times 100}{R \text{ estándar} \times W_m \times D \times 100}$$

$$\%MCFA = \frac{R \text{ muestra} \times \%V \times W \times 100}{R \text{ estándar} \times W_m \times D \times 100}$$

DONDE:

R muestra: Relación promedio del área del principio activo (MCFA o CFPA), a la del estándar interno. (Para cada muestra).

- R estándar: Relación promedio del Área del principio activo (MCFA ó CFPA), a la del estándar interno. (Para cada estándar de referencia).
- % V: Valoración del estándar de referencia, expresado en %.
- W: Peso en mg del estándar de referencia.
- Wm: Peso en g de la muestra a analizar.
- D: Cantidad declarada en el marbete como 100% del principio activo / cápsula; expresada en mg.

4. RESULTADOS

VALIDACION DEL METODO.

A. ESPECIFICIDAD.

Se trabajó con las siguientes muestras:

Lote estándar:

Formulación:

Clorhidrato de fenilpropanolamina	50mg
Maleato de clorfeniramina	8mg
Excipiente c.b.p.	400mg

- a) Maleato de clorfeniramina estándar.
- b) Clorhidrato de fenilpropanolamina estándar.
- c) Placebo.
- d) Placebo adicionado de MCFE y CFPA (estándares sometidos a degradación).

Se sometieron a las siguientes condiciones de degradación durante un periodo de dos meses:

Temperatura ambiente.

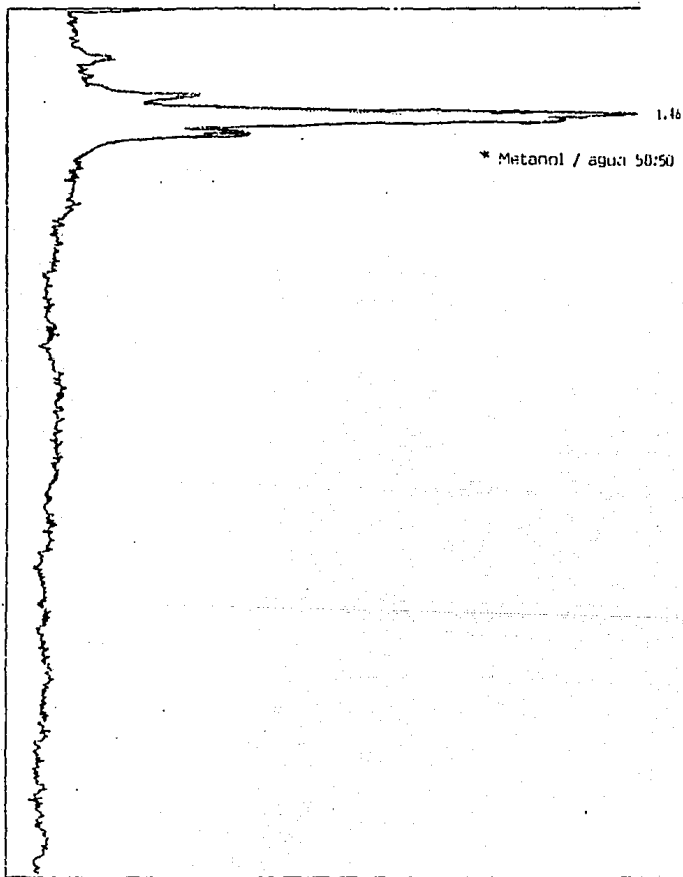
Luz solar.

60°C.

Estabilidad acelerada en autoclave (15lb / 15min).

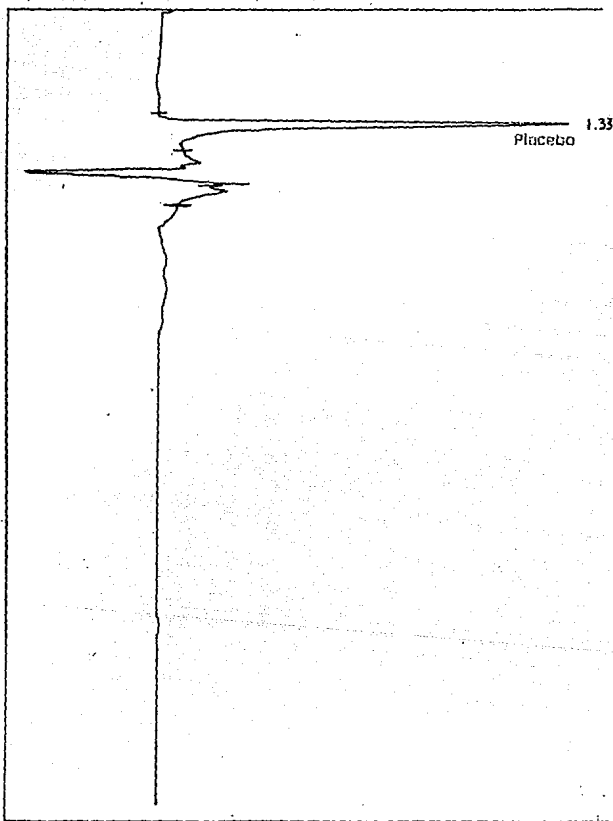
Cromatograma No. 1

Fase móvil / disolvente *



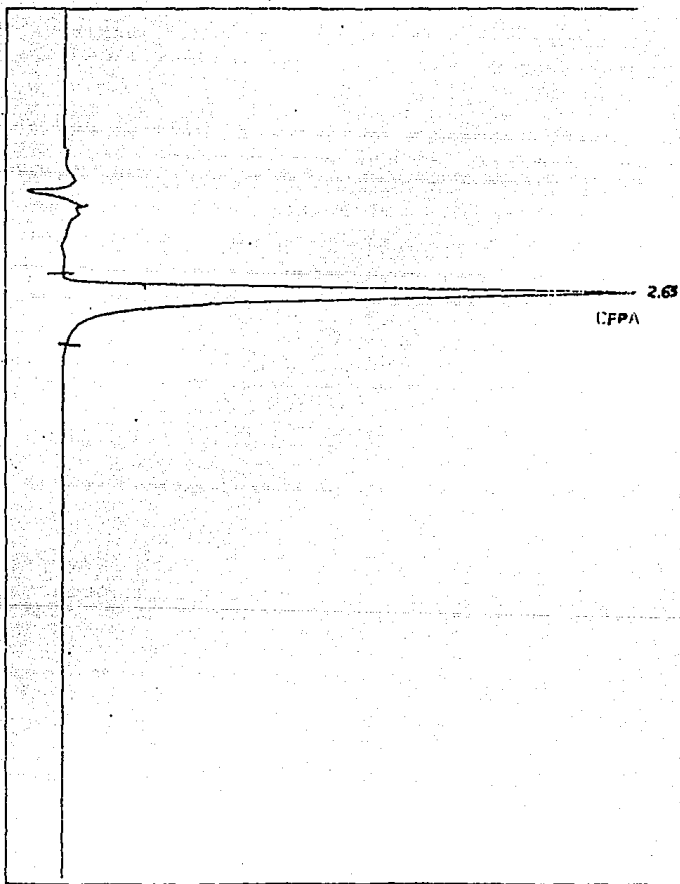
Cromatograma No. 2

Placebo a temperatura ambiente.



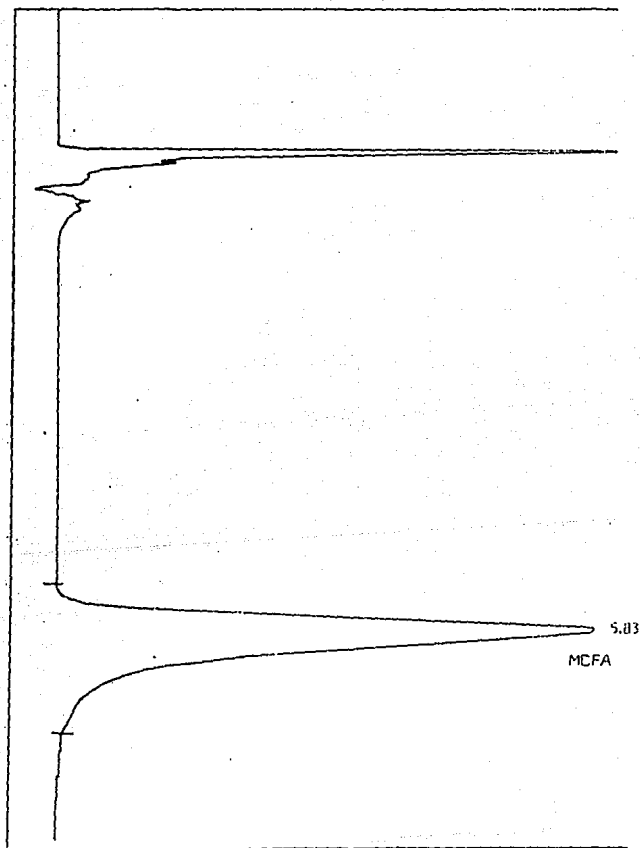
Cromatograma No. 3

CFPA a temperatura ambiente.



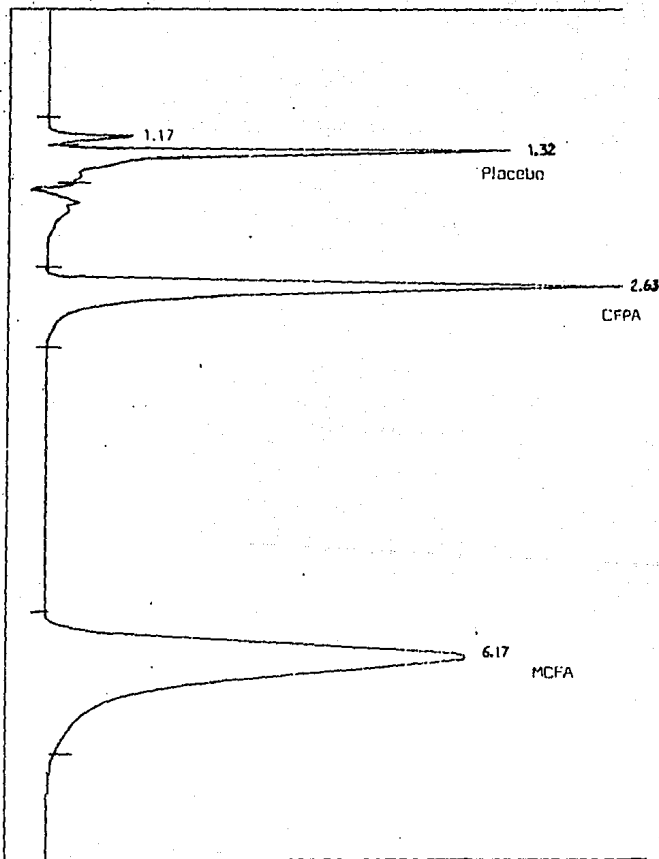
Cromatograma No. 4

MCFA a temperatura ambiente.



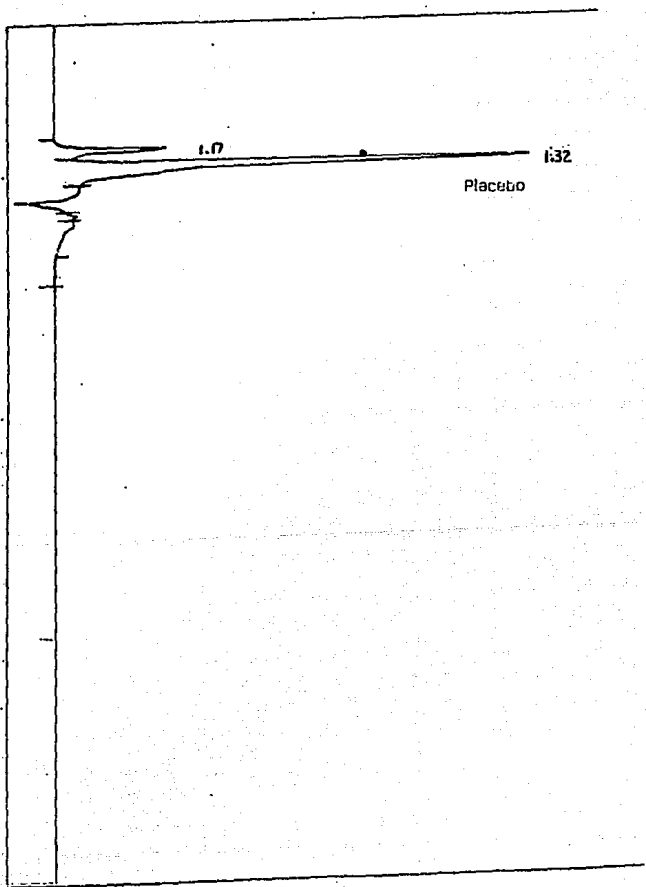
Cromatograma No. 5

Placebo adicionado de CFPA y MCFA,
a temperatura ambiente

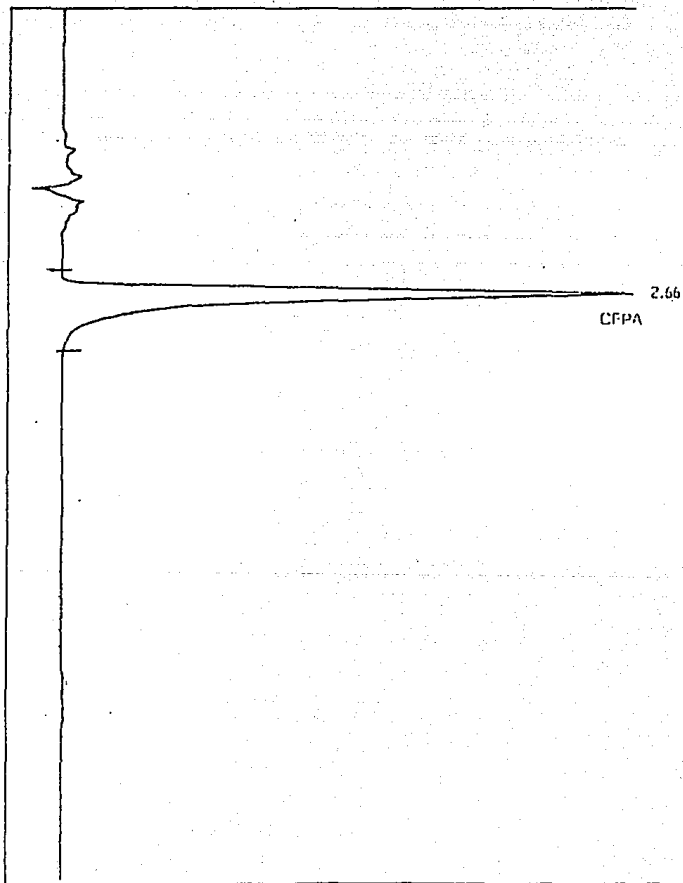


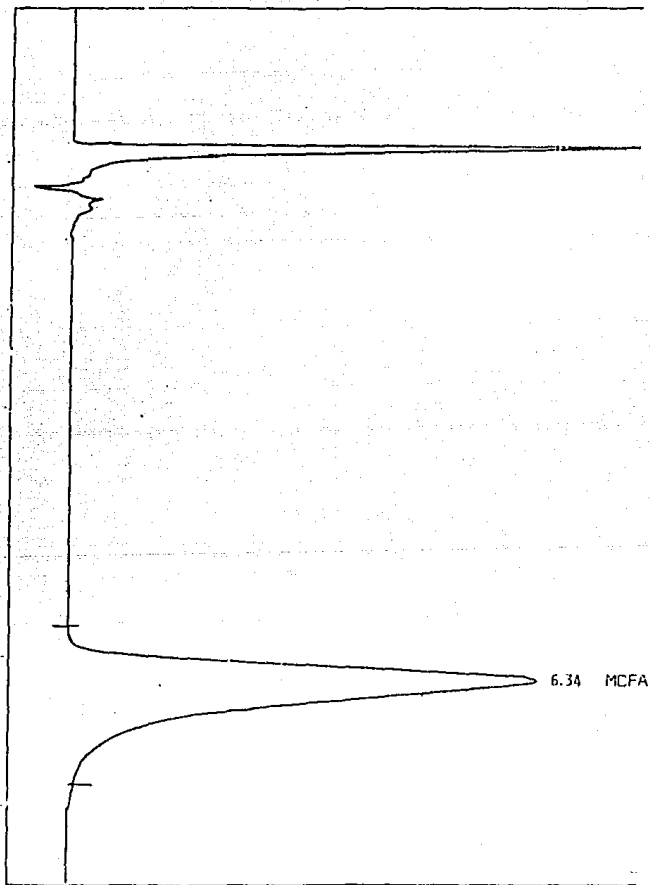
Cromatograma No. 6

Placebo degradado en luz solar.



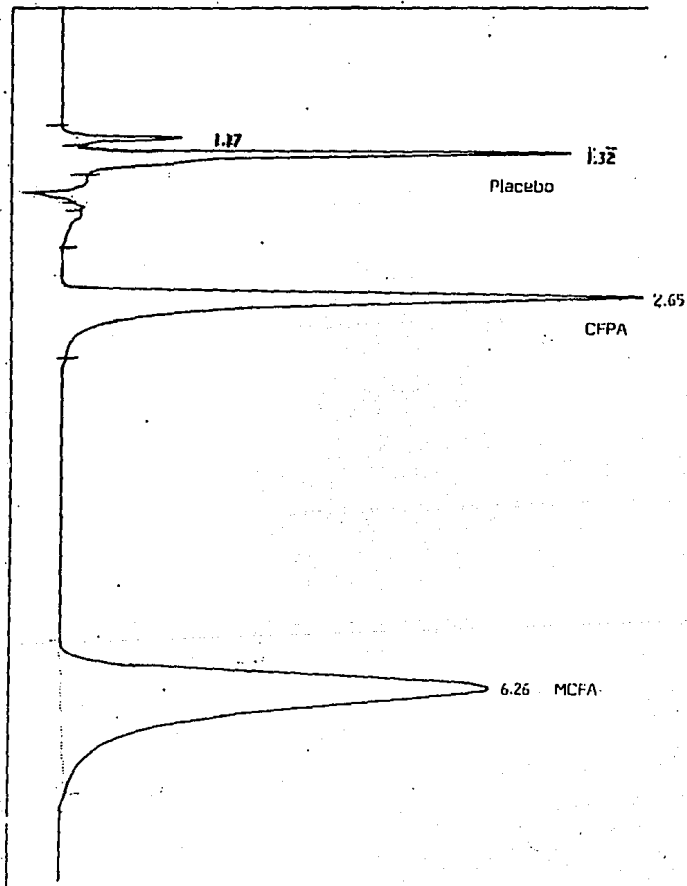
CFPA degradado en luz solar.





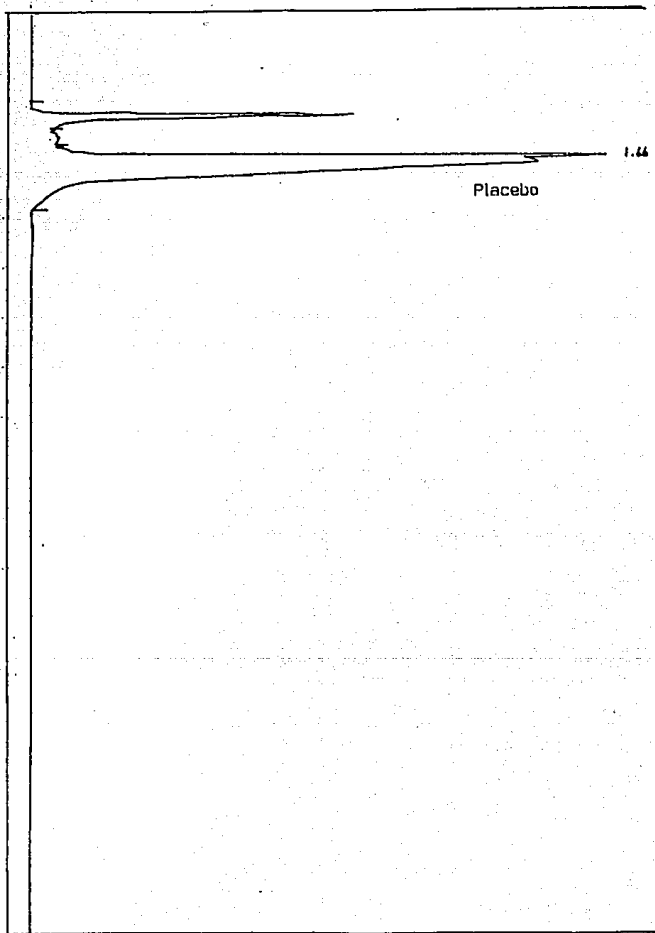
Cromatograma No. 9

Placebo adicionado de CFPA y MCFA,
degradado en luz solar.



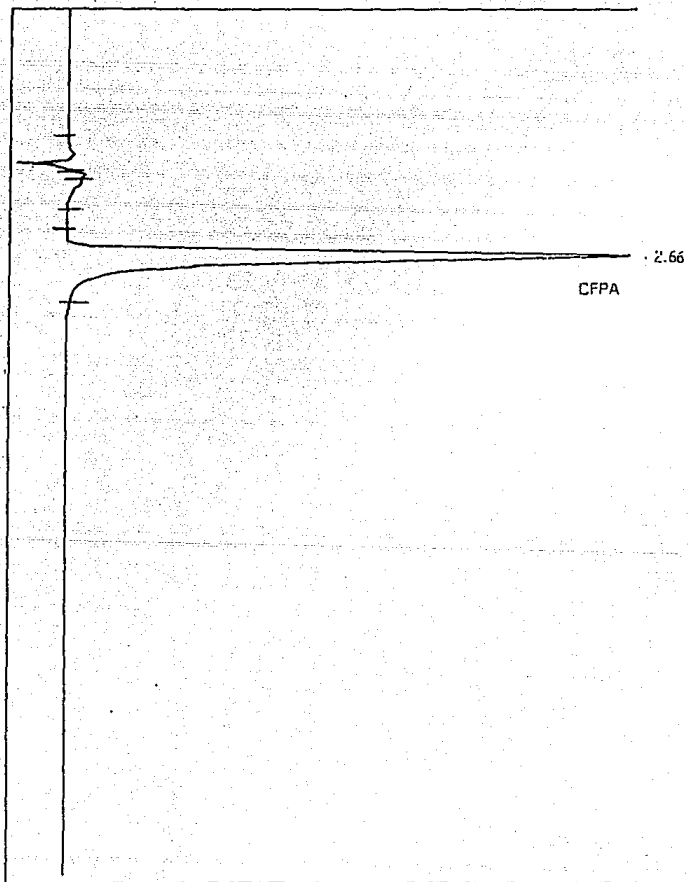
Cromatograma No. 10

Placebo degradado a 60°C.



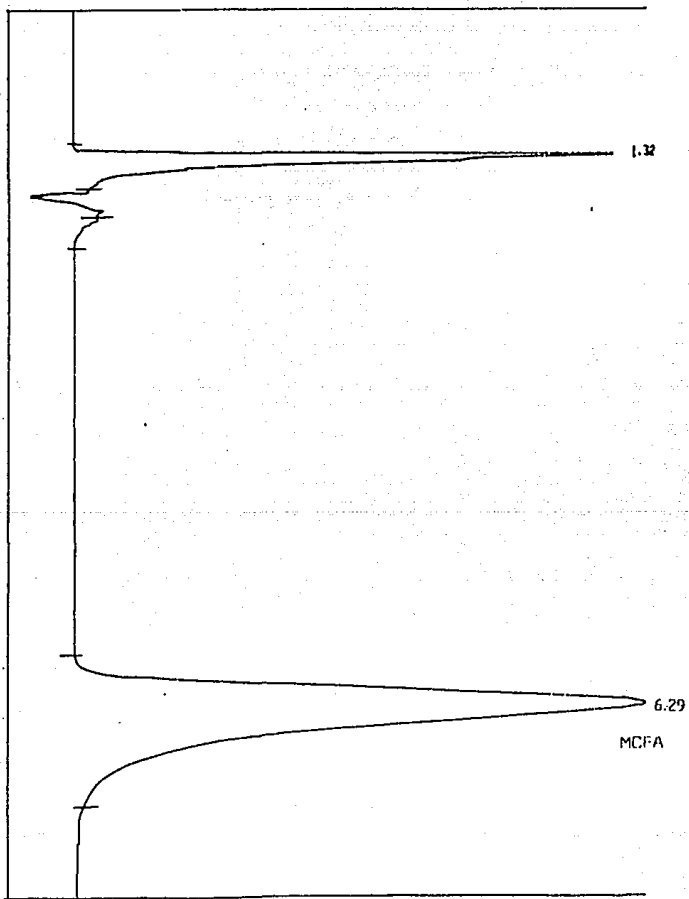
Cromatograma No. II

CFPA degradado a 60°C.



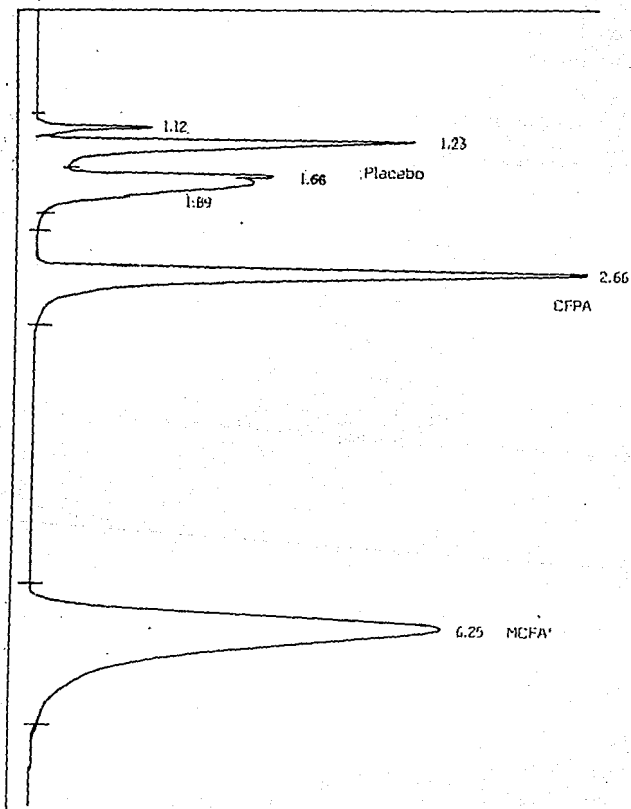
Cromatograma No. 12

MCFA degradado a 60°C.



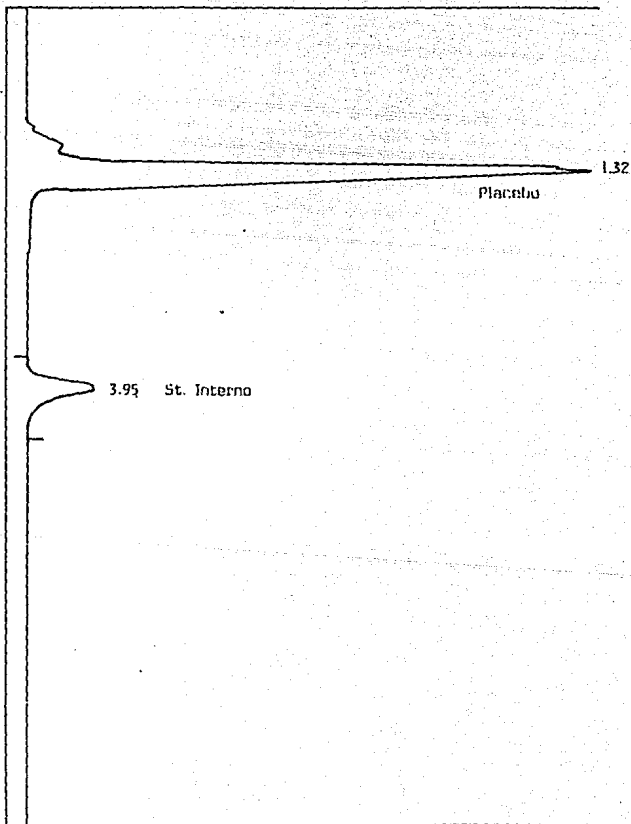
Cromatograma No. 13

Placebo adicionado de CFPA y MCFA,
degradado a 60°C.



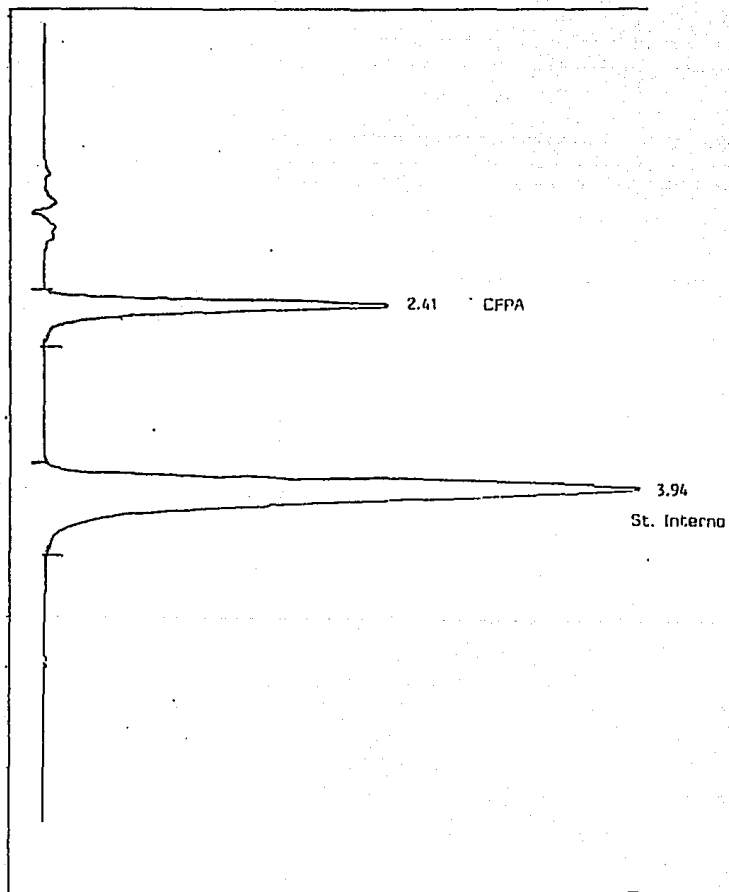
Cromatograma No. 14

Placebo degradado en autoclave.



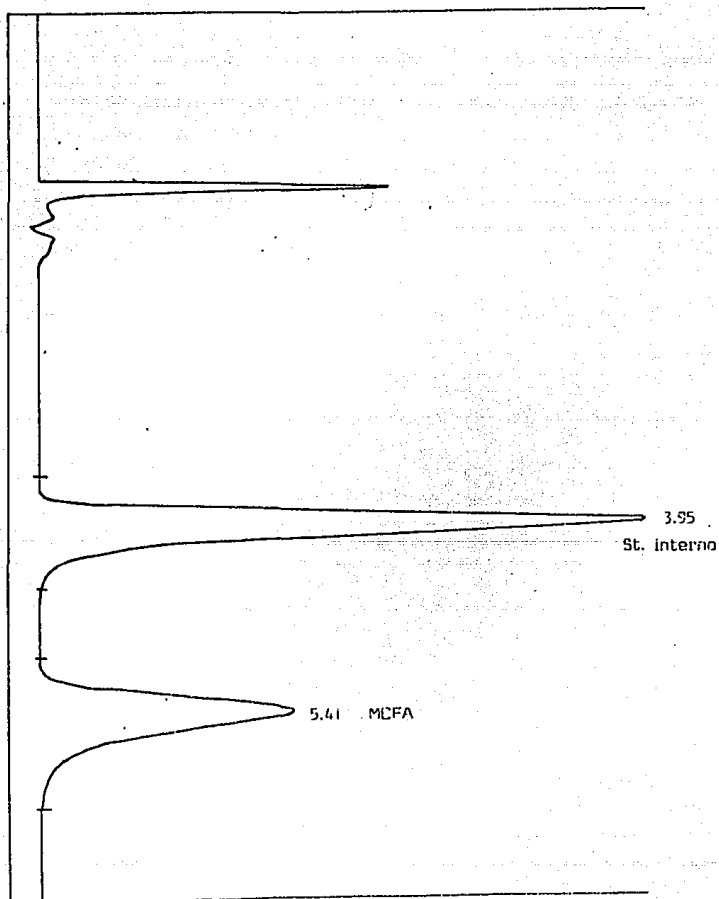
Cromatograma No. 15.

CFPA degradado en autoclave.



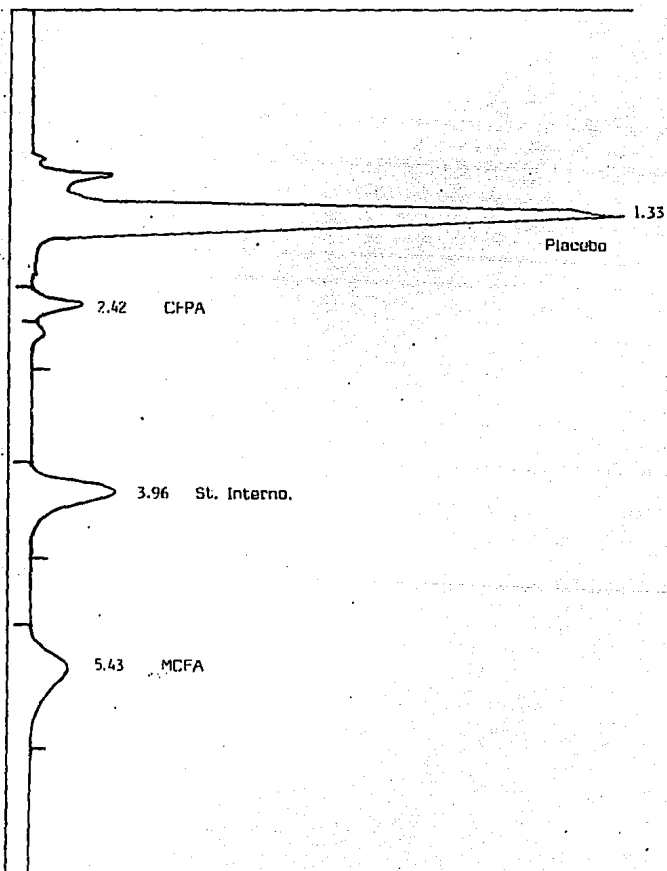
Cromatograma No. 16

MCFA degradado en autoclave.



Cromatograma No. 17.

Placebo adicionado de CFPA y MCFA,
degradados en autoclave.



De los cromatogramas, se observa lo siguiente:

I. MUESTRAS EXPUESTAS A TEMPERATURA AMBIENTE.

No se observó degradación en ninguna de las muestras.

II. MUESTRAS EXPUESTAS A LUZ SOLAR.

No se observó degradación en ninguna de las muestras.

III. MUESTRAS EXPUESTAS A 60°C.

Se observa degradación en el pico correspondiente al placebo; el cual consiste de semillas de sacarosa, cubiertas con gelatina, almidón, colorante, cera microcristalina y diesteurato de glicerilo.

IV. DEGRADACION EN AUTOCLAVE.

Se observa un pico de degradación cercano al tiempo de retención del CFFA, en la mezcla degradada y en el placebo.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se preparó una solución conteniendo placebo adicionado del 100% de lo establecido en el marbete del producto, para cada uno de los principios activos (MCFA y CFFA), de acuerdo al método analítico e inyectando por duplicado la muestra a los siguientes tiempos: muestra recién preparada, a la 1/2hr, 2hrs, 4hrs, 8hrs, 12hrs, 24hrs y 48hrs.

Comparándose contra un estándar a la misma concentración, preparado al momento de cada determinación.

Concentración CFPA: 0.260mg/ml

Concentración MCFA: 0.040mg/ml

A continuación, se muestran los resultados promedio obtenidos.

Tabla No. 1

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

TIEMPO hrs	% RECUPERACION	
	CFPA	MCFA
to	98.0	99.8
1/2	99.2	101.2
2	98.9	100.9
4	97.5	101.6
8	99.4	101.9
12	99.0	100.1
6	98.6	99.2
48	97.7	99.0

CFPA:

$$\bar{X} = 98.54\%$$

$$DE = 0.7170$$

$$CV = 0.720\%$$

MCFA:

$$\bar{X} = 100.46\%$$

$$DE = 1.0950$$

$$CV = 1.09\%$$

Criterio de aceptación:

$$CV < 2\%$$

B. LINEARIDAD.

Se determinó la linealidad para cada uno de los principios activos contenidos en la formulación; siguiendo el método analítico descrito.

I. LINEARIDAD DEL SISTEMA.

Se preparó una curva de calibración a partir de una misma solución, conteniendo 130mg de CFPA y 20mg de MCFA. A partir de esta se determinaron concentraciones del 40, 60, 80, 100 y 120% para cada uno de los estándares de referencia; efectuándose el análisis por duplicado para cada dilución. (En la tabla No. 2 y 3, se muestran los resultados promedio obtenidos).

II. LINEARIDAD DEL METODO.

Se determinó mediante el análisis de una curva de calibración conteniendo placebo adicionado de 130mg de CFPA y 20mg de MCFA en un rango de concentraciones del 40, 60, 80, 100 y 120% para cada uno de los estándares de referencia; realizando el análisis en dos días diferentes y por triplicado de cada concentración. (En la tabla No. 4, 5, 6 y 7, se muestran los resultados promedio obtenidos).

Tabla No. 2
LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA MCFA

%	mg/ml Adicionados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
40	0.0160	0.0162	101.2
60	0.0240	0.0241	100.4
80	0.0320	0.0317	99.1
100	0.0400	0.0396	99.0
120	0.0480	0.0463	96.5

$b = 0.0010$

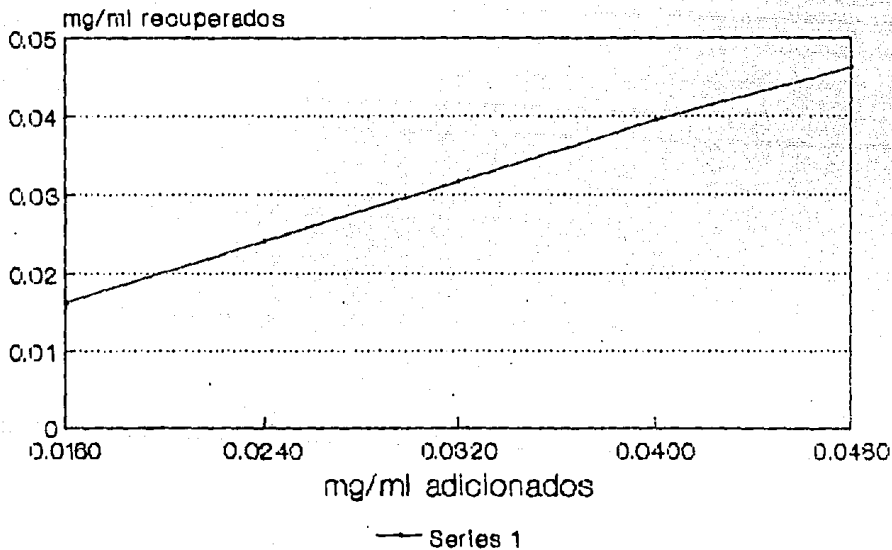
$m = 0.9460$

$r = 0.9996$

$r^2 = 0.9992$

Gráfica No. 1

LINEARIDAD DEL SISTEMA MALEATO DE CLORFENIRAMINA



$$b = 0.0010, m = 0.9460, r = 0.9996,$$

Tabla No. 3
LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA CFPA

%	mg/ml Adicionados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
40	0.1040	0.1030	99.00
60	0.1560	0.1560	100.00
80	0.2080	0.2060	99.25
100	0.2600	0.2600	100.00
120	0.3120	0.3130	100.25

$b = -0.002$

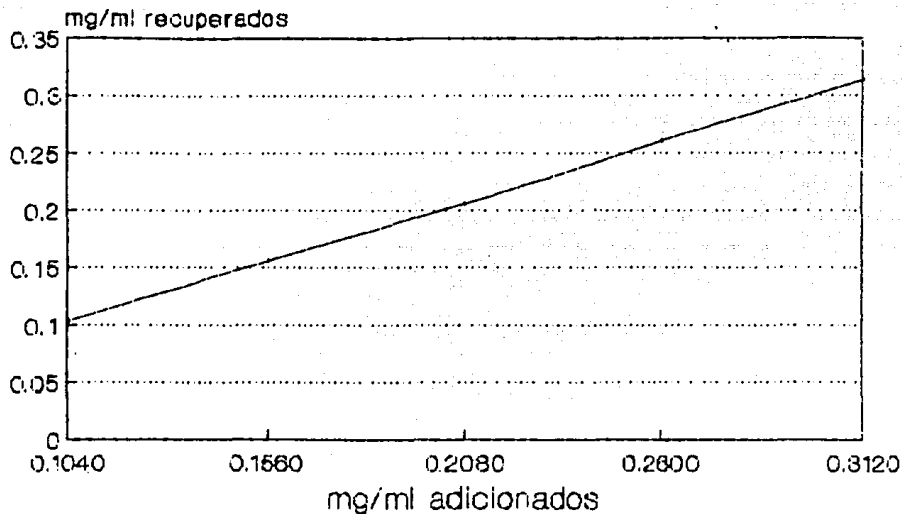
$m = 1.0077$

$r = 0.9999$

$r^2 = 0.999$

Gráfica No. 2

LINEARIDAD DEL SISTEMA CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA



— Series 1

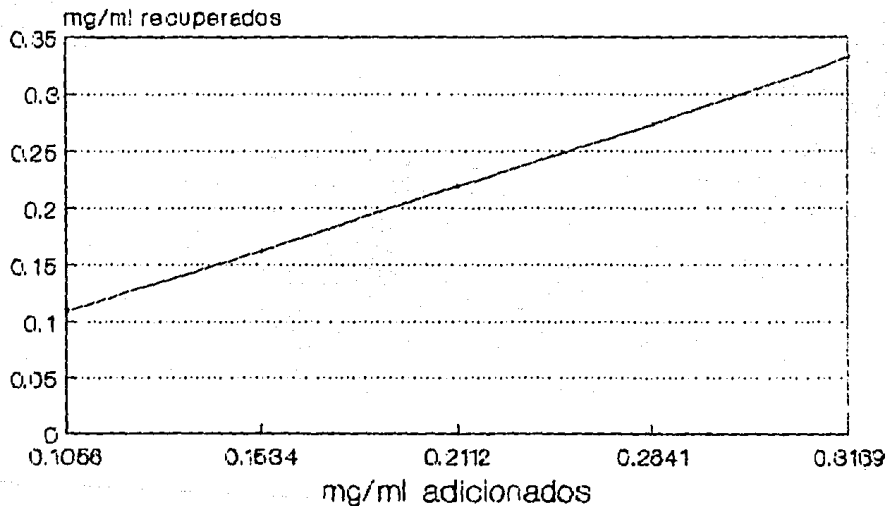
$b = -0.002$, $m = 1.0077$, $r = 0.9999$

Tabla No. 4
 LINEARIDAD DEL METODO PARA CFP
 (Primer día)

%	mg/ml Adicionados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
40	0.1056	0.1098	104.00
60	0.1534	0.1625	102.60
80	0.2112	0.2196	104.00
100	0.2641	0.2733	103.50
120	0.3169	0.3324	104.90

\bar{X} = 103.8% m = 1.050
 DE = 0.8400 b = -0.0027
 CV = 0.80% r = 0.9998
 r² = 0.999

LINEARIDAD DEL METODO PARA CFP PRIMER DIA



— Series 1

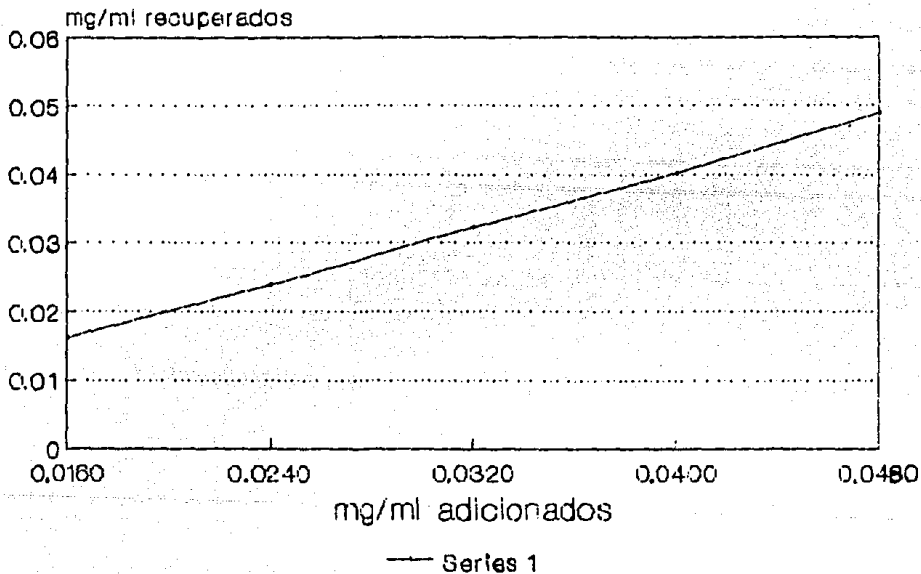
$b = -0.0027, m = 1.050, r = 0.9998$

Tabla No. 5
 LINEARIDAD DEL METODO PARA MCFA
 (Primer día)

%	mg/ml Adicionados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
40	0.09160	0.0162	101.10
60	0.0240	0.0239	99.80
80	0.0320	0.0322	100.70
100	0.0400	0.0402	100.60
120	0.0480	0.0488	101.80

\bar{X} = 100.8%	m = 1.018
DE = 0.7314	b = -0.0003
CV = 0.72%	r = 0.9998
	$r^2 = 0.999$

LINEARIDAD DEL METODO PARA MGFA PRIMER DIA



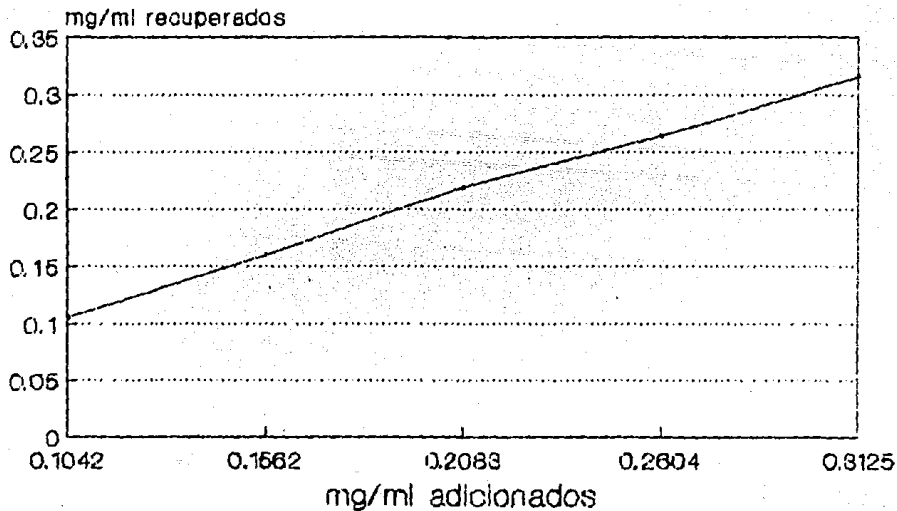
$b = -0.0003, m = 1.0180, r = 0.9998$

Tabla No. 6
 LINEARIDAD DEL METODO PARA CFPA
 (Segundo día)

%	mg/ml Adicionados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
40	0.1042	0.1052	101.10
60	0.1562	0.1603	102.60
80	0.2083	0.2190	101.25
100	0.2604	0.2635	101.20
120	0.3125	0.3159	101.10

\bar{X} = 101.43% m = 1.007
 DE = 0.6610 b = 0.003
 CV = 0.65% r = 0.999
 r² = 0.999

LINEARIDAD DEL METODO PARA CFPA SEGUNDO DIA



— Series 1

$$b = 0.003, m = 1.007, r = 0.999$$

Tabla No. 7.
 LINEARIDAD DEL METODO PARA MCFA
 (Segundo día)

%	mg/ml Adicionados	mg/ml Recuperados	% Recuperación
40	0.0160	0.0167	104.00
60	0.0241	0.0252	104.60
80	0.0321	0.0330	102.70
100	0.0402	0.0409	101.80
120	0.0482	0.0493	102.30

$\bar{X} = 103.08\%$

DE = 1.177

CV = 1.14%

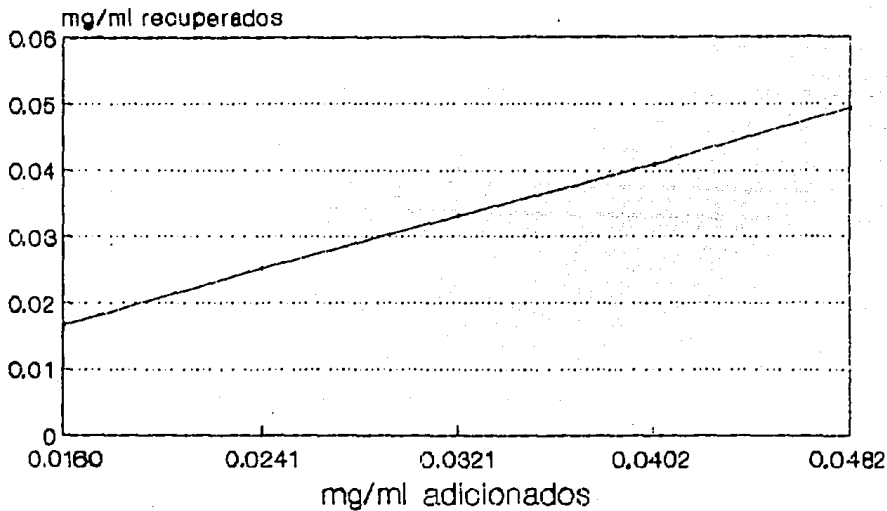
m = 1.005

b = -0.0007

r = 0.9999

r² = 0.999

LINEARIDAD DEL METODO PARA MCFA SEGUNDO DIA



— Series 1

$$b = -0.0007, m = 1.006, r = 0.9999$$

CRITERIO DE ACEPTACION

PENDIENTE (m) Aproximadamente 1

ORDENADA AL ORIGEN (b) Aproximadamente 0

COEFICIENTE DE CORRELACION (r) \geq 0.999

COEFICIENTE DE DETERMINACION (r^2) \geq 0.980

COEFICIENTE DE VARIACION (CV) \leq 2.0%

C. EXACTITUD AL 100%.

Se analizaron 6 muestras de placebo adicionado con el 100% de cada uno de los estándares de referencia; inyectando por triplicado cada muestra. (Ver tabla No. 8).

Concentración CFPA: 0.26mg/ml

Concentración MCFA: 0.04%mg/ml

Tabla No. 8

EXACTITUD AL 100% CFPA.

No. de muestra	mg/ml CFPA adicionados	mg/ml CFPA recuperados	% CFPA recuperados
		\bar{X}	
1	0.2600	0.2635	101.3
2	0.2616	0.2630	100.5
3	0.2654	0.2680	101.0
4	0.2608	0.2658	101.9
5	0.2602	0.2678	103.0
6	0.2602	0.2660	102.2

$$\bar{X} = 101.65\%$$

$$DE = 0.9005$$

$$CV = 0.88\%$$

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2\%$$

Tabla No. 9

EXACTITUD AL 100% MCFA

No. de muestra	mg/ml CFPA adicionados	mg/ml CFPA recuperados	% CFPA recuperados
		\bar{X}	
1	0.0402	0.0419	104.2
2	0.0400	0.0420	105.0
3	0.0397	0.0412	103.7
4	0.0408	0.0423	103.7
5	0.0403	0.0417	103.5
6	0.0393	0.0407	103.5

$\bar{X} = 103.9\%$

DE = 0.5819

CV = 0.56%

Criterio de aceptación:

$CV \leq 2\%$

C. PRECISION DEL SISTEMA.

Se determinó analizando una misma solución estándar correspondiente al 100% de cada uno de los estándares de referencia. Se realizó el análisis por sextuplicado.

A continuación se muestran los resultados promedio:

Tabla No. 10

PRECISION DEL SISTEMA PARA CFPA.

No. de muestra	mg/ml CFPA adicionados	mg/ml CFPA recuperados	% CFPA recuperado
1	0.2600	0.2603	100.11
2	0.2600	0.2593	99.80
3	0.2600	0.2600	100.03
4	0.2600	0.2602	100.09
5	0.2600	0.2599	99.98
6	0.2600	0.2605	100.21

$$\bar{X} = 100.04\%$$

$$DE = 0.14\%$$

$$CV = 0.14\%$$

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2\%$$

Tabla No. 11

PRECISION DEL SISTEMA PARA MCFA.

No. de muestra	mg/ml MCFA adicionados	mg/ml MCFA recuperados	% MCFA recuperado
1	0.0400	0.0401	100.16
2	0.0400	0.0400	100.00
3	0.0400	0.0401	100.26
4	0.0400	0.0398	99.51
5	0.0400	0.0400	100.15
6	0.0400	0.0399	99.84

$$\bar{X} = 99.98\%$$

$$DE = 0.2758$$

$$CV = 0.27\%$$

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2\%$$

D. PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD).

Se llevó a cabo mediante el análisis de tres muestras de un lote estándar aprobado, de acuerdo al método analítico propuesto; en dos días diferentes por dos analistas diferentes utilizando una concentración cercana al 100% de lo establecido para cada uno de los principios activos contenidos en la formulación. Se realizó el análisis por triplicado de cada muestra.

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2\%$$

A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

Tabla No. 12

PRECISION DEL METODO

DIA	ANALISTA I (\bar{X})		ANALISTA II (\bar{X})	
	%CFA	%CFPA	%CFA	%CFPA
1	101.22	102.57	101.00	103.60
	100.20	102.90	100.70	102.60
	102.70	103.96	102.30	102.73
2	100.60	101.71	101.46	103.91
	101.04	102.01	102.64	104.02
	99.82	103.54	101.32	102.86

CFPA:

$$DE = 0.73$$

$$CV = 0.71\%$$

$$Ri/a = \pm 0.231\%$$

$$Ri = \pm 0.642\%$$

MCFA:

$$DE = 0.91$$

$$CV = 0.90\%$$

$$Ri/a = \pm 0.24\%$$

$$Ri = \pm 0.65\%$$

Donde:

Ri/a = Reproducibilidad inter-dia / analista.

Ri = Reproducibilidad inter-analistas.

TOLERANCIA.

La tolerancia se llevó a cabo inyectando por triplicado una muestra. Variando la proporción de la fase móvil $\pm 5\%$ de lo establecido.

Se encontraron los siguientes resultados:

Tabla No. 13

TOLERANCIA

Composición de la fase móvil	Tiempos de retención (min)		
	CFPA	Std. Int.	MCFA
85:15 metanol/(NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.0 \pm 0.05 condiciones normales.	2.56	4.39	6.11
80:20 metanol/(NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.0 \pm 0.05	2.30	3.59	4.85
90:10 metanol/(NH ₄) ₂ SO ₄	3.25	6.62	9.69

Se observa que el método tolera un cambio de $\pm 5\%$ en la proporción de fase móvil; ya que existe una buena resolución en los picos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Del análisis estadístico obtenido en la validación del método analítico por CLAR, se encontró lo siguiente:

Se demostró que el método analítico es lineal en un rango de concentraciones del 40 al 120% para los principios activos cuantificados, ya que los parámetros estadísticos evaluados: coeficiente de correlación, pendiente, ordenada al origen y coeficiente de variación; cumplen con las especificaciones para esta prueba, como se muestra en las tablas No. 2 a la 7 y gráficas No. 1 a 6.

El método es preciso y exacto ya que los coeficientes de variación para ambos principios activos, determinados a partir de los datos de recuperación al 100% de lo declarado en el marbete del producto, cumple con el criterio establecido, como se observa en las tablas No. 8 a la 10.

La reproducibilidad del método en el mismo día y en días diferentes, presenta un coeficiente de variación menor a lo establecido, (tabla No. 11).

El método analítico es específico para la cuantificación de MCFA y CFPA en la forma farmacéutica, como se muestra en los cromatogramas No. 1 al 14, ya que los productos de degradación encontrados en las muestras expuestas a luz solar, 60° C, temperatura ambiente, durante un periodo de dos meses y degradación acelerada en autoclave, se separan de los principios activos.

Se encontró un producto de degradación en el placebo expuesto a 60°C y en autoclave, esto puede deberse al colorante empleado ya que físicamente se observa que la muestra expuesta a 60° C, pierde color. (Cromatogramas No. 10, 13, 14 y 17).

No se encontraron productos de degradación en las muestras expuestas a 60° C, luz solar y temperatura ambiente. (Cromatogramas No. 2 al 9; 11, 12, 13).

En la degradación acelerada en autoclave, se detectó un producto de degradación en el pico correspondiente al CFPA lo cual indica que ésta se descompone a altas temperaturas (121 °C /15lb); pudiendo ambos ser cuantificables. (cromatograma No. 17).

Las muestras después de ser preparadas de acuerdo al método analítico descrito, pueden permanecer 48hrs a temperatura ambiente sin que esto las afecte ya que el coeficiente de variación encontrado es menor a lo establecido.

(Tabla No. 1).

Por lo anteriormente expuesto se puede concluir que el método analítico puede emplearse en el control de calidad del producto y como indicador de estabilidad, cumpliéndose con el objetivo planteado en este trabajo. Además, es un método rápido, confiable y económico para la determinación de CFFA y MCFA en microesferas de liberación sostenida.

B I B L I O G R A F I A

1. Ante M. N. / Phyllis R. Brown
Reversed Phase
High Performance Liquid Chromatography
Theory, Practice & Biomedical Applications.
1982 John Wiley & Sons N.Y.
2. Martindale
The Extra Pharmacopeia
27th. edition.
London 1077.
3. Clarke E.G.C.
Isolation & Identification of Drugs.
2a. edition.
London 1986.
4. Florey
Analitical Profiles of Drug Substances.
1978. Vol VII y XIII.

5. Harold M. Mc. Nair / Benjamin Esquivel H.
Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.
Sria. General de la Organización de los Estados
Americanos.
Washington D.C.

6. Goodman L. S. / Gilman A.
Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.
6a. edición 1981.
Editorial Panamericana.

7. Abdel Monen / Henkel
Essentials of Drug Product Quality.
The C.V Mosby Company.

8. Official Methods of Analysis
Association of Official Analytical Chemistry.

9. GLC & HPLC Determination of Therapeutic Agents.
Chromatographic Science Series.
Edited by Kiyoshi Tsuji.
Part. 1, 2, 3.
1978.

10. Remington's Pharmaceutical Sciences.
15a. ed. 1975
Mack Publishing Company.

11. USP XXII
1990.

12. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
5a. ed. México 1988.

13. Stevenson R. & Johnson B. L.
Basic Liquid Chromatography
Varian Associates
U.S.A 1978.

14. Snyder, L. R. & Kirkland
Introduction to Modern Liquid Chromatography
2th. Ed. Jonh Willey & Sons, Inc.
U.S.A 1979.

15. A. Fryde & M. T. Gilbert
Applications of High Performance Liquid Chromatography
Edit. Chapman & Hall.
N. Y. 1979.

16. Adrianus J. Vanderwielen & Edward A. H.
Guidelines for Assay Validation
Pharmaceutical Tecnology March, 1982.

17. Merck Index.
An Encyclopedia of Chemicals & Drugs.
9th. ed.
Merck & Co. Inc. U.S.A 1976.

18. Curso Teórico Práctico de Espectroscopia y Validación
de Técnicas Analíticas.
AFM, México 1981.

19. Hamilton, Sowell.
Introduction to High Performance Liquid Chromatography.
Chapman & Hall.
London 1977.

20. Dr. José Helman.
Farmacotecnica teórica y práctica.
Ed. Continental.
1a. edición. Julio 1981.
Tomo VII, Cap. 61.

21. Método Interno

SF & F Farmacéutica

1989.

22. K.A. Connors.

Curso de Análisis Farmacéutico.

Ed. Reverté, S.A.

2a. edición.

España 1981.

23. Curso Introductorio a la Cromatografía de Líquidos de
Alta Resolución

Perkin Elmer

1988.