

Nº 77
24/1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*DESARROLLO FARMACEUTICO DE UN
ANTIGRI PAL PEDIATRICO EN
SOLUCION*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIELA IÑIGUEZ TORRES

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE GREEN



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:
Capítulo I: Introducción	4
 PRIMERA PARTE: Desarrollo de la Formulación Antigripal Pediátrica	
Capítulo II: Generalidades	6
1. Soluciones	6
1.1 Definición y Tipos.	6
1.2 Consideraciones generales de esta forma farmacéutica.	7
1.3 Métodos de Manufactura	9
2. Características organolépticas, sabor y saborizantes.	11
3. Preformulación y Formulación.	13
4. Estabilidad de Formas Farmacéuticas líquidas y Análisis de Estabilidad Acelerada	15
4.1 Factores de Influyen en el Deterioro de los Medicamentos	15
4.2 Lاپso de vigencia de los medicamentos	16
4.3 Análisis de Estabilidad Acelerada	17
4.4 Control de Soluciones para Administración Oral en general.	18
4.5 Esquema para determinar la estabilidad.	19
5. Monografía del Paracetamol	21
5.1 Descripción	21
5.2 Nombres genéricos y químicos	21
5.3 Fórmula estructural	21
5.4 Propiedades Físicas	21
5.5 Estabilidad e Incompatibilidades	23
5.6 Pruebas de Identificación	24

5.7	Métodos de Análisis	24
5.8	Usos	24
5.9	Aspectos Biofarmacéuticos	25
5.10	Interacciones con otros Fármacos	25
5.11	Toxicología	25
5.12	Dosis	26
6.	Monografía del Maleato de Clorfeniramina.	27
6.1	Descripción	27
6.2	Nombres genéricos y químicos.	27
6.3	Fórmula estructural	27
6.4	Propiedades Físicas	27
6.5	Estabilidad e Incompatibilidades	29
6.6	Métodos de Análisis	29
6.7	Usos	30
6.8	Aspectos Biofarmacéuticos	30
6.9	Toxicología	31
6.10	Dosis	31
7.	Monografía del Clorhidrato de Fenilpropanolamina	32
7.1	Descripción	32
7.2	Nombres genéricos y químicos	32
7.3	Fórmula estructural	32
7.4	Propiedades Físicas	32
7.5	Estabilidad e Incompatibilidades	34
7.6	Métodos de Análisis	34
7.7	Usos	35
7.8	Aspectos Biofarmacéuticos	35
7.9	Toxicología	35
7.10	Dosis	35
Capítulo III:	Parte Experimental	37
1.	Resultados del Desarrollo de las Formulaciones	37
2.	Resultados del Estudio de Estabilidad de la Formulación seleccionada.	43

SEGUNDA PARTE: Desarrollo y Validación de dos Métodos Analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la Cuantificación de los Principios Activos de la Forma Farmacéutica.

Capítulo IV Generalidades	51
1. Descripción de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	51
1.1 Características de los Equipos para CLAR	53
2. Conceptos Teóricos	56
2.1 Tiempo de Retención	56
2.2 Resolución	57
2.3 Platos Teóricos	57
2.4 Factor de Capacidad y Factor de Separación	58
3. Desarrollo de Técnicas Analíticas	60
4. Validación de Técnicas Analíticas	61
Capítulo V: Parte Experimental	62
1. Desarrollo de los Métodos Analíticos	62
1.1 Método Desarrollado para Paracetamol	64
1.2 Método Desarrollado para Clorhidrato de Fenilpropanolamina (PPA) y Maleato de Clorfeniramina (CTM)	66
2. Validación de los Métodos Analíticos	75
2.1 Validación del Método para Paracetamol	75
2.2 Validación del Método para PPA y CTM	100
TERCERA PARTE: Conclusiones	
Capítulo VI: Del Desarrollo de la Formulación.	130
Capítulo VII: Del Desarrollo y Validación de los Métodos Analíticos.	131
CUARTA PARTE: Bibliografía	134

CAPITULO I: INTRODUCCION.

Las compañías farmacéuticas reconocen ciertos productos como seguros y eficaces, y observan que van dirigidos a ciertos sectores de la población. En el laboratorio donde se efectuó este trabajo, se observó que la población menor de 2 años no contaba con un medicamento antigripal, por lo que surgió esta necesidad y se desarrolló una formulación con 3 principios activos reconocidos como seguros y eficaces.

Como se trata de una nueva formulación, fue necesario también el desarrollo de métodos analíticos para su control de calidad y sus correspondientes estudios de estabilidad.

Este trabajo consta de dos partes;

En la primera, se describe el desarrollo de la formulación de la solución oral pediátrica antigripal con: paracetamol, clorhidrato de fenilpropanolamina y maleato de clorfeniramina. Así como su procedimiento de manufactura.

En la segunda parte, se describe el desarrollo de dos métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para cuantificar a los principios activos en el producto terminado; también fue necesario validar estos métodos por medio de una serie de experimentos, para comprobar que éstos fueran exactos, precisos e indicativos de estabilidad.

PRIMERA PARTE

DESARROLLO DE LA FORMULACION DE LA SOLUCION ANTIGRIPIAL PEDIATRICA

CAPITULO II: GENERALIDADES:

1. SOLUCIONES.

1.1 Definición y tipos:

Las soluciones se pueden definir como sistemas físicamente homogéneos, constituidas por uno más fármacos activos disueltos en un vehículo adecuado. (9).

Tomando en cuenta la naturaleza del disolvente las soluciones líquidas se pueden clasificar en:

- Acuosas
- Oleosas
- Hidroalcohólicas

Tomando en cuenta la vía de administración pueden clasificarse en:

- Orales
- Locales(dérmicas)
- Oftálmicas
- Nasales
- Oticas
- Rectales (enemas)
- Vaginales
- Parenterales

Las soluciones orales son generalmente acuosas, de uno o más fármacos con o sin saborizantes, aromatizantes o agentes colorantes. Son formas farmacéuticas que se administran por vía oral y son mas fáciles de absorber que los medicamentos sólidos.

La forma de solución es la indispensable para que un fármaco se absorba por el tracto gastrointestinal; por eso las soluciones presentan las mayores ventajas desde ese punto de vista así como la ventaja de su facilidad de administración. Frente a esta garantía de mejor aprovechamiento terapéutico y a una mayor facilidad operativa en su elaboración, las soluciones presentan una serie de problemas que se deben resolver con los fundamentos fisicoquímicos y biofarmacéuticos que rigen la estabilidad y presentación de los fármacos en solución. Entre tales problemas debe considerarse que, los fármacos activos están disueltos en un vehículo que es agua o

que la contiene en gran proporción, por lo que pueden sufrir hidrólisis o bien interactuar con alguno de los otros componentes de la fórmula, provocando pérdida o disminución de la actividad, con modificación aparente o no de los caracteres organolépticos del producto. (7,9) .

1.2 Consideraciones generales de esta forma farmacéutica:

1.2.1 Solubilidad; (6),(7),(9)

La solubilidad de una sustancia en un disolvente en particular indica la máxima concentración a la cual una solución puede ser preparada con esa sustancia y ese disolvente. La solubilidad depende de la constitución química del soluto pero haciendo una selección de diferentes agentes solubilizantes, o de diferentes sales químicas de la sustancia activa, alteración del pH de la solución o sustitución en parte o total del disolvente se puede obtener una solubilización de mayores cantidades de soluto de lo que se podía esperar si no se hacen estas modificaciones. En otros casos será necesario recurrir al procedimiento de micelación o comicelación.

La temperatura es un factor importante que determina la solubilidad de un fármaco y su preparación como solución. Otros factores además de la temperatura, pueden afectar a la solubilidad; factores de presión, la acidez o basicidad de la solución, el estado de subdivisión del soluto y la agitación física aplicada durante el proceso de disolución. La solubilidad de una sustancia química pura a una temperatura y presión dadas es constante; sin embargo su velocidad de solución que es la velocidad a la cual se disuelve, depende del tamaño de partícula de la sustancia y de la agitación.

1.2.2 Papel del pH: (6) (7) (9)

Un gran número de agentes químicos terapéuticos son ácidos o bases débiles. La solubilidad de estos agentes está

marcadamente influenciada por el pH del medio. Estos fármacos al reaccionar con ácidos o bases fuertes pueden formar sales solubles en agua.

Pero en esto deben considerarse otros factores; el pH que satisfice otros requerimientos del producto tales como la estabilidad y compatibilidad fisiológica. Además como el pH es crítico para mantener la solubilidad de un fármaco, el sistema debe ser adecuadamente amortiguado.

1.2.3 Cosolvencia: (6) (7) (9)

Algunos electrolitos y moléculas no polares frecuentemente tienen una solubilidad muy pobre en agua. Su solubilidad puede ser incrementada por la adición de un disolvente miscible con el agua el cual tenga una buena solubilidad para esa sustancia. Este proceso es conocido como cosolvencia, y los disolventes usados en combinación para incrementar la solubilidad del soluto, son llamados cosolventes.

Etanol, sorbitol, glicerina, propilenglicol y varios miembros de los polímeros del polietilenglicol representan a los cosolventes útiles y aceptables generalmente en la formulación de líquidos acuosos.

1.2.5 Solubilización por tensoactivos: (7),(9) La solubilización por tensoactivos es el paso de las moléculas de un soluto poco soluble en agua, a una solución acuosa de un agente tensoactivo para formar una solución termodinámicamente estable.

Este fenómeno consiste en el empleo de agentes tensoactivos como medios de solubilización. Estas sustancias se caracterizan por estar constituidas por moléculas anfifílicas. Esa dualidad de acción de estas moléculas permite, cuando se agregan al agua, orientarse en la interfase líquido-aire formando una capa superficial monomolecular con la porción hidrofílica introducida en el agua, y la parte lipofílica en el aire. Cuando toda la superficie libre del agua alcanza a cubrirse de moléculas el exceso de moléculas que

se agreguen al agua se sumergen en su seno, humectándose y formando aglomerados moleculares a favor de la atracción que ejercen entre sí los grupos menos polares de las moléculas. Estos agregados son micelares y por absorción o adsorción son capaces de encerrar a moléculas lipofílicas que de esta manera quedan uniformemente interpuestas en el medio acuoso.

1.2.6 Solubilización por complejamiento: (7),(9)

Ciertas moléculas orgánicas pueden ser solubilizadas aprovechando el efecto producido al agregar otra sustancia que al interactuar con ella forma un nuevo compuesto que resulta más soluble que el primitivo. Este procedimiento se llama complejamiento y en él, la segunda sustancia o complejante se encuentra en pequeña proporción respecto a la sustancia principal.

1.2.7 Hidrotropía: (7),(9)

La hidrotropía consiste también en aprovechar el efecto de una segunda sustancia (agente hidrotrópico), pero en este caso la proporción de ésta, es grande respecto de la principal.

1.3 Métodos de manufactura: (6),(7),(9)

Las operaciones que comprende el proceso de elaboración de las soluciones son principalmente: la solubilización y filtración.

El procedimiento de manufactura en sí, es muy sencillo, las soluciones diluidas, que se preparan de la rápida disolución de materiales, se realizan adicionando el o los solutos al disolvente con agitación constante hasta la homogenización. Cuando las soluciones son más concentradas o el soluto se disuelve más lentamente se utiliza en el procedimiento calor. Los solutos presentes en pequeñas concentraciones, particularmente colores, deben ser disueltos antes de mezclarse con el resto del lote para asegurar la

completa disolución de la sustancia. Como una regla general, cada vez, antes de agregar un nuevo componente, se debe de asegurar que el componente anterior esté completamente disuelto.

En el medio industrial la disolución se efectúa en tanques de acero inoxidable con doble pared para calentar por agua caliente o vapor de agua, provistos de un sistema de agitación. Todo el equipo debe ser sanitizado (esterilizado si es posible) antes de su uso.

La filtración se realiza por pasaje directo a través de septos filtrantes o bien agregando a la solución un intermedio de filtración como pulpa de celulosa o tierra de infusorios. El septo filtrante puede ser de telas apropiadas o placas de amianto-celulosa.

Siempre que se utilicen materiales adsorbentes, éstos deben ser previamente ensayados en su capacidad de retener también algún componente de la fórmula de manera parcial o total.

La solución filtrada generalmente se almacena en un tanque adyacente hasta que el departamento de control de calidad da la aprobación del granel. Después la solución filtrada se conduce a la línea de envasado, ya sea por tanques transportadores o por bombeo (o aprovechando flujo por gravedad) a través de un conducto adecuado para líquidos. En la línea de envasado se fracciona el líquido en envases adecuados.

En lo que se refiere al envase de líquidos farmacéuticos el método específico de llenado que se use depende de las características del líquido (viscosidad, tensión superficial, producción de espuma, etc.)

Existen tres métodos básicos de llenado: gravimétrico, volumétrico y de nivel constante. Los dos últimos son los más empleados en el llenado de líquidos farmacéuticos.

2. CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS. SABOR Y SABORIZANTES: (9,4,6,7,8).

Tratándose de formas farmacéuticas orales y sobre todo las líquidas, es imprescindible que tengan cualidades organolépticas características, las que pueden definirse como el conjunto de sensaciones que son capaces de provocar antes, durante y después de su ingestión.

Lo más frecuente es que el organismo perciba una síntesis olfativa, gustativa, táctil y visual, es decir un complejo de sensaciones que resulta de las propiedades de los componentes de la fórmula que estimulan a los receptores de la zona buco-faríngea-nasal simultáneamente con los de la vista y el tacto.

Es posible, después de años de estudio y trabajos físico-fisiológicos, crear, modificar, atenuar o enmascarar un olor, sabor o ambos a la vez sobre bases científicas y técnicas, para adaptar una formulación a las exigencias presentes.

Si el medicamento es para niños, tendrá que considerar que existen sabores que agradan más a este sector que a otros de edad mayor.

En ocasiones se opta entre disminuir la intensidad del sabor desagradable o bien enmascararlo con otro más potente. La elección del colorante debe estar de acuerdo con el sabor final del producto, que generalmente se asocia con un color.

Edulcorantes: las sustancias edulcorantes naturales integran una gran proporción de los sólidos que componen las soluciones. Ejem: sacarosa, sorbitol 70%.

Los edulcorantes sintéticos más empleados son la sacarina sódica, el ciclamato sódico o cálcico y el aspartame.

Control de la viscosidad: en ocasiones es deseable incrementar la viscosidad de un líquido para poderlo paladear y que logre fluir bien el líquido. Esto se puede lograr incrementando la concentración de azúcar o por la incorporación de agentes de control de viscosidad tales como la polivinilpirrolidona.

Saborizantes y aromatizantes: la producción de sabores y aromas se ha desarrollado enormemente en los últimos años frente a la demanda de la industria alimentaria y de bebidas de uso popular.

Muchos de esos productos son de aplicación en preparaciones farmacéuticas.

El farmacéutico puede disponer de sabores y aromas, algunos derivados de zumos y esencias naturales y otros creados combinando productos sintéticos de composición variable:

- Aceites esenciales.
- Zumos naturales concentrados por liofilización.
- Los aromas en polvo.

Además de los edulcorantes y de los colorantes, es frecuente la adición de astringentes (taninos) acidulantes, (ácido cítrico, ácido tartárico), salinos (cloruro de sodio, glutamato de sodio) que resaltan o potencian el sabor final elegido.

Colorantes: la apariencia total de los productos líquidos depende principalmente de su color y claridad.

La coloración de un medicamento permite la identificación del mismo y contribuye a definir su aceptación o rechazo por los pacientes. El agregar una sustancia colorante permite además uniformar el color total del preparado.

Aunque es importante hacer notar que la tendencia actual es el no usar colorantes en las formulaciones, a menos que sea indispensable. Y también se prefiere el uso de colorantes naturales; debido a problemas de toxicidad y a su interferencia en los métodos de análisis.

3. PREFORMULACION Y FORMULACION:

Preformulación puede ser definido como el proceso de obtención de datos sobre los fármacos, que permitan el desarrollo racional de formas farmacéuticas seguras, eficaces y estables.

Los parámetros estudiados van de acuerdo a la forma farmacéutica, dosis, vía de administración; en soluciones es útil investigar la estabilidad, solubilidad, pKa, velocidad de disolución, pH, y la interacción del fármaco con excipientes. (6,7,8)

Esta etapa ayuda a plantear una o varias formulaciones. Es necesario hacer también una caracterización de excipientes posibles. (7)

En la preparación de soluciones farmacéuticas líquidas se utilizan como ingredientes; uno o más disolventes, para solubilizar a los activos; conservadores, para prevenir el crecimiento microbiano; estabilizadores, para prevenir la descomposición de los fármacos; y colorantes y/o saborizantes, para darle el acabado final al producto.

Entre los diferentes excipientes tenemos: (6)

Agentes acidificantes: usados para proveer de un medio ácido para la estabilidad del producto que lo requiera. Ejemplos: ácido cítrico, ácido ascórbico.

Agentes alcalinizantes: usados para dar un medio alcalino al producto que lo requiera para su estabilidad. Ejemplos: solución de fosfatos, carbonato de sodio.

Conservador antimicrobiano: usado para prevenir el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. Ejemplos: Benzoato de sodio, metilparabeno y propilparabeno.

Antioxidante: agente que previene la inestabilidad por reacciones oxidativas. Ejemplos: metabisulfito sódico.

Agente amortiguador: usado para resistir los cambios en el pH. Ejemplos: metafosfato de potasio, fosfato de potasio monobásico y dibásico, acetato de sodio.

Agente quelante: utilizado en líquidos como estabilizador al secuestrar a metales que pueden catalizar reacciones de oxidación. Ejemplo: edetato disódico.

Colorante: usado para impartir color a las preparaciones farmacéuticas. Ejemplos: Rojo No. 3 .

Saborizante: usado para impartir un sabor agradable y frecuentemente un olor a las preparaciones farmacéuticas. Ejemplos: cocoa, mentol, aceite de naranja, vainilla, aceite de anís.

Disolvente: agente usado para disolver excipientes y principios activos en la preparación de soluciones. Ejemplos: etanol , glicerina, propilenglicol, agua purificada, etc.

Agente edulcorante: usado para impartir dulzor a la preparación. Ejemplos: dextrosa, sacarina sódica, sacarosa, aspartame.

El vehículo más empleado para las soluciones es el agua deionizada.

El etanol es el disolvente más empleado en farmacotecnia después del agua, pero en las soluciones su uso está limitado a una determinada proporción en el vehículo, sobre todo en las preparaciones destinadas a la terapéutica infantil, debido a su actividad farmacológica.

Otro solvente muy usado en farmacotecnia es la glicerina, en soluciones interviene formando parte del vehículo para mejorar la solubilidad de muchas sustancias; favorece su empleo, el sabor dulzaino, alta densidad y viscosidad que posee. Puede incluirse sin los inconvenientes del alcohol en las preparaciones pediátricas y contribuye también a mejorar los caracteres organolépticos del producto terminado.

{ También se recurre al uso de mezclas con propilenglicol, líquido incoloro más fluido que la glicerina, cuyo sabor menos agradable, resulta limitante para el empleo de éste, muy eficaz disolvente en preparaciones de uso oral.

La solución de sorbitol al 70% p/p se ha introducido en los últimos tiempos como disolvente de muchas sustancias, aprovechándose además su viscosidad y sabor dulce. Otra particularidad es que las soluciones de algunos fármacos en sorbitol presentan más estabilidad y otra que facilita la absorción del principio activo. Se utiliza generalmente en mezcla con agua, glicerina u otro polialcohol y es compatible con el etanol en cierta graduación. (9.1.3.4)

4. ESTABILIDAD DE FORMAS FARMACEUTICAS LIQUIDAS Y ANALISIS DE ESTABILIDAD ACELERADA (6,7,8,9).

Estabilidad es la habilidad de una formulación particular en un determinado contenedor para permanecer dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas. Y así el tiempo de caducidad es el periodo durante el cual la preparación permanece estable. Y se entiende por periodo de estabilidad de una preparación farmacéutica, cómo el tiempo que transcurre desde la fecha de su manufactura hasta que su actividad biológica o química no es menor de un porcentaje predeterminado de la cantidad etiquetada y sus características físicas y microbiológicas no han cambiado apreciablemente.

4.1 Factores que influyen en el deterioro de los medicamentos:

4.1.1 Temperatura:

El aumento de la temperatura produce frecuentemente un marcado aumento de la velocidad de reacción ; para reacciones en solución una generalización útil es que la velocidad de descomposición se duplica por un aumento de 10 °C en la temperatura.

4.1.2 pH:

La velocidad de degradación de muchos fármacos está estrechamente ligada al pH; quizás sea el factor más importante a tener en cuenta para asegurar la máxima estabilidad. Determinados fármacos pueden ser estables a un pH dado pero en contacto con otros de diferente pH pueden descomponerse. Por ello es útil la elección un buen amortiguador.

4.1.3 Catálisis por metales:

Los fenómenos de oxidación que se producen en una solución medicamentosa pueden catalizarlos el cobre, el hierro el manganeso. Estas trazas de metales pueden tener su origen

en; el mismo fármaco, el disolvente o el recipiente. Es difícil obtener los excipientes o principios activos libres de trazas metálicas. El EDTA se usa como estabilizador en los casos en que metales pesados causan o aceleran catalíticamente la oxidación de los principios activos en solución. Otras sustancias que actúan como quelantes son: el ácido cítrico, el ácido tartárico y sus sales.

4.1.4 Luz:

La descomposición de los productos farmacéuticos resultante de la absorción de la energía radiante ha adquirido mayor importancia en los últimos años debido a la estructura química compleja de fármacos nuevos. El producto de muchas reacciones fotolíticas es la formación de radicales libres.

Los fármacos fotosensibles para su conservación deben envasarse en vidrio ámbar o recipientes oscuros.

4.1.5 Oxígeno:

Los compuestos que se desarrollan en la oxidación pueden modificar el olor y sabor de las soluciones, cuando se forman productos volátiles.

Para prevenir la degradación mediante esta vía, se pueden adicionar agentes antioxidantes. Las degradaciones que se observan en este tipo de procesos de óxido-reducción, se deben sobre todo al oxígeno atmosférico. En las soluciones hay que tener en cuenta el oxígeno disuelto en los disolventes y el oxígeno del aire de la parte superior de los recipientes cerrados. Cuando se considera que es necesario, puede desalojarse el oxígeno, burbujeando en la solución un gas inerte como nitrógeno o dióxido de carbono.

4.2 Lapso de vigencia de los medicamentos:

Puede haberse atribuido a un producto, un lapso determinado de validez en forma provisoria por un examen reducido de lotes, cuya fabricación industrial aún puede confirmarse por medio de los ensayos de varias fabricaciones sucesivas. Los resultados permitirán prolongar su periodo de

vigencia.

Se pueden realizar estudios en condiciones relativamente normales y otros en condiciones climáticas artificiales. Se entiende por estudio normal o envejecimiento natural, el que se realiza sobre las muestras almacenadas en un local sin equipo especial, pero protegido de variaciones excesivas.

Un medicamento puede considerarse como estable por el tiempo que no muestre ningún signo visible de alteración y su eficacia en principio activo no baje de 90% de la dosis declarada, (vida útil). La tolerancia de una disminución máxima de 10% es una cuestión convencional; no se cuenta con argumentos para apoyar esta elección, pero representa, para todos los especialistas en la materia, un compromiso admisible, razonable y generalmente reconocido.

4.3 Análisis de Estabilidad Acelerada:

Con objeto de determinar la vida útil del medicamento y poder establecer su lapso de vigencia y fecha de caducidad, se pueden realizar pruebas de estabilidad acelerada, por medio de los cuales la estabilidad de una formulación puede predecirse, por almacenamiento de ésta, bajo condiciones que aceleren el cambio de una manera definida y pronosticable.

Con ellas se trata en principio de suplir el tiempo por el factor temperatura. Con esto se ahorra tiempo, que en algunas ocasiones, se requiere para iniciar la comercialización del medicamento.

Una parte integral de cualquier estudio de estabilidad debe incluir la consideración del material de empaque y el efecto de éste en su contenido. Es importante almacenar el producto final en el mismo contenedor en el cual va a ser vendido y conservarlo hasta su fecha de expiración.

La mayoría de los líquidos orales son empacados en contenedores de vidrio, polietileno de alta densidad (HDPE) o en envases de polietilentereftalato (PET), con tapas de polietileno, polipropileno o metálicas.

4.3.1 Control de Estabilidad y limitaciones de las pruebas aceleradas:

Para decidir sobre el tipo de estudio de estabilidad a desarrollar es preciso tener en cuenta que las pruebas aceleradas tienen sus limitaciones derivadas de las propiedades físicas y químicas de los fármacos y de las características de las formas farmacéuticas.

Para realizar el control de estabilidad y para conocer la conservación, hay que plantearse lo que se debe analizar y que métodos emplear.

4.3.2 Métodos analíticos:

En los casos en que la coexistencia de los productos de degradación y del principio activo hagan impracticable el análisis se impone separar uno de los otros, lo que se hace empleando alguna técnica cromatográfica, (Capa fina, de Gases, de Líquidos de alta resolución, etc.).

El anteproyecto de Norma para los estudios de estabilidad del Colegio de QFB's (28), establece que todos los análisis que se lleven a cabo en los estudios de estabilidad, deberán realizarse con métodos analíticos que tengan las siguientes características: lineales, exactos, precisos y específicos.

4.4 Control de soluciones para administración oral en general:

Se recomienda realizar los siguientes controles: (28)

- Concentración de los agentes activos.
- Concentración de conservadores en su caso.
- Color, olor y sabor.
- pH.
- Claridad.
- Viscosidad.
- Toxicidad.
- Reto de la Actividad Preservativa.
- Cuenta Microbiana.

Los resultados que se obtengan deberán compararse con los encontrados al iniciar las pruebas de estabilidad.

4.5 Esquema para determinar la estabilidad:

El esquema puede dividirse en dos partes:

a) Exposición del medicamento a pruebas aceleradas para predecir su periodo de vida en las condiciones de almacenaje normales.

b) Exposición a condiciones más realistas durante un periodo más prolongado en condiciones normales durante dos o tres años, para confirmar las conclusiones a que se llegó en los ensayos acelerados.

a) Pruebas aceleradas: (28)

Para poder obtener una fecha de caducidad tentativa de 24 meses a temperatura ambiente, se requerirán datos analíticos de 3 lotes piloto fabricados en las condiciones y equipo de producción, en el material de empaque, (envase primario), con que el producto saldrá al mercado, a 35°C (a 75% de humedad relativa), 45°C y 60°C (los productos que lo soporten), $\pm 2^\circ\text{C}$ en todos los casos, por un periodo de 3 meses durante el cual el principio activo no deberá de perder más de un 10% de la potencia o contenido mostrada en el análisis inicial, y el aspecto no deberá haber sufrido ningún cambio apreciable. En algunos casos será necesario guardar y analizar muestras mantenidas a 5°C.

Normalmente el protocolo de estabilidad acelerada también contempla análisis a los 6 meses, en muestras almacenadas a TA, 35°C y 45°C y análisis a los 12 meses, en muestras almacenadas a TA y 35°C. Si los resultados obtenidos muestran que el principio activo no se degrada más del 10%, confirmaremos en cada etapa la predicción de 24 meses de vida útil del medicamento obtenida en los resultados obtenidos en los tres primeros meses.

b) Pruebas de almacenaje prolongado: (28)

Con objeto de comprobar o modificar la fecha de caducidad tentativa, se requerirá de 3 lotes de producción de

preferencia con lotes diferentes del (los) principio(s) activo(s), fabricados bajo las mismas condiciones, con la misma formulación y envasados en el mismo material de empaque (el del mercado), que se mantengan a temperatura ambiente (envejecimiento natural), por el tiempo correspondiente a la fecha de caducidad que se desee comprobar o modificar y/o a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (75% de humedad relativa) por un periodo de tiempo que variará entre 12 y 24 meses dependiendo de la fecha de caducidad que se quiera obtener;

12 meses a 37°C (75% H.R.) corresponde a 36 meses de caducidad

18 meses a 37°C (75% H.R.) corresponde a 48 meses de caducidad

24 meses a 37°C (75% H.R.) corresponde a 60 meses de caducidad

5. MONOGRAFIA DEL PARACETAMOL :

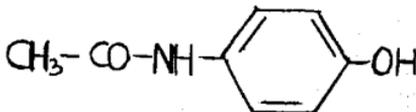
5.1 Descripción:

Polvo blanco cristalino, inodoro y de sabor amargo.

5.2 Nombres genéricos y químicos:

Acetaminofén, acetaminofenol; 4'hidroxiacetanilida;
p-hidroxiacetanilida; p-acetaminofenol; N-acetil-p-aminofenol
p-acetamidofenol; p-acetilaminofenol.

5.3 Fórmula estructural:



$C_8H_9NO_2$

P.M. 151.6

5.4 Propiedades físicas:

5.4.1 Espectro infrarrojo:

En una dispersión sólida de KBr, el Acetaminofén presenta los siguientes máximos: 1659 cm^{-1} (C=O); 3326 cm^{-1} (N-H); 3162 cm^{-1} (O-H).

5.4.2 Espectro ultravioleta:

Presenta dos máximos en los diferentes disolventes en que se ha determinado;

Etolanol	249 y 290 nm
Eter anhidro	247 y 283 nm
Agua	242.5 y 283 nm

Absortividades específicas del acetaminofén en diferentes disolventes: (10)

Disolvente:	Longitud de onda:	Absortividad específica:
Etolanol	249 nm	13090 a 14000
	288 nm	2000 a 2120
Metanol	249 nm	13600
Agua (pH 2 a 3)	242 nm	11000
Agua (pH 7.2)	242.5 nm	10037
Agua (pH 10 a 11)	258 nm	10500

5.4.3 Solubilidad:

Temp. (°C):	Concentración:	Medio:
20	11.3 mg/ml	Agua
25	11.6 mg/ml	Agua
37	20.0 mg/ml	Agua
100	52.0 mg/ml	Agua
37	23.8 mg/ml	Buffer pH 6
20	1 en 10	Etolanol
20	1 en 10	Metanol
20	1 en 15	Acetona
20	1 en 10	Propilenglicol
20	1 en 50	Cloroformo
20	1 en 40	Glicerina
20	Insoluble	Benceno
20	Insoluble	Eter
20	Insoluble	Pentano
20	Insoluble	Eter petróleo

Se incrementa la solubilidad del acetaminofén con cafeína y fenazona, pero la teofilina la disminuye. (1)

5.4.4 Ionización y pH:

El acetaminofén es un ácido débil; su solución acuosa saturada tiene un pH de 5.3 a 6.5 a 25°C. El valor de pKa se sitúa entre 9.0 y 9.5. (1,10)

5.4.5 Punto de fusión:

Funde en el rango comprendido entre 160 y 171 °C.

5.5 Estabilidad e incompatibilidades:

El acetaminofén es muy estable en soluciones acuosas. Su vida media en soluciones amortiguadas a pH de 6.0 es estimada en 21.8 años. La degradación en solución acuosa puede ser catalizada por ácidos y bases, obteniéndose una vida media de 0.73 años a pH de 2.0 y de 2.28 años a pH de 9.0; siendo los productos de estas degradaciones p-aminofenol y ácido acético.

También se ha encontrado que en solución es un poco sensible a la luz y puede degradarse por un mecanismo que involucra una predisociación del enlace N-C.

El acetaminofén seco y puro es muy estable hasta por lo menos 45°C; es relativamente estable a la oxidación por efecto del aire.

Al ser formulado con aspirina reaccionan y producen ácido salicílico y diacetil-p-aminofenol; éste no se forma en mezclas secas, el derivado diacetilado se hidroliza a acetaminofén y p-aminofenol en condiciones húmedas.

Un estudio *in vitro* de tabletas de acetaminofén con sorbitol, indicó que éste formó un complejo no absorbible con el acetaminofén.

El acetaminofén mezclado con antipirina, Irgapirina, Irgafén ácido 2-fenilquinolin-4-carboxílico o clorhidrato de fenidramina, se vuelve pegajoso.

Ha sido reportado que el acetaminofén interacciona con el cloral y el sorbitol. También forma un complejo molecular con el piramidón. (12,13,3) .

5.6 Pruebas de identificación:

Han sido reportados diversos métodos de identificación en la literatura, entre los cuales se encuentran los siguientes:

1. Puede ser identificado por su punto de fusión.
2. Puede ser identificado por su tiempo de retención en cromatografía de gases o de líquidos.
3. El espectro de absorción de infrarrojo en una dispersión de bromuro de potasio exhibe máximos solamente en las mismas longitudes de onda de una preparación similar de acetaminofén estándar.
4. El espectro de absorción ultravioleta de una solución 1 en 200 000 de acetaminofén en una solución 1 a 100 de ácido clorhídrico 0.1 N en metanol, exhibe un máximo y un mínimo a las mismas longitudes de onda de una solución similar de acetaminofén estándar.
5. Si se añade una gota de cloruro férrico (solución de prueba) a 10 ml de una solución de acetaminofén 1 en 100, se produce una coloración azul violeta. (10)

5.7 Métodos de Análisis: (10)

- a) Procedimientos gravimétricos.
- b) Volumétricos.
- c) Espectrofotométricos al UV.
- d) Fotocolorimétricos.
- e) Cromatografía en columna de intercambio iónico.
- f) Cromatografía en columna de partición.
- g) Cromatografía en papel y en capa fina.
- h) Cromatografía de Gases.
- i) Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

5.8 Usos: (10,11)

Se emplea principalmente como analgésico y antipirético, y por esto es de uso alternativo a la aspirina, además de presentar menos efectos secundarios.

5.9 Aspectos biofarmacéuticos:

La concentración máxima promedio de acetaminofén total seguida de la administración oral, se alcanza entre 30 y 60 minutos, dependiendo del individuo. El tiempo de vida media promedio en plasma en humanos, ha sido reportado desde 1.5 horas hasta 3.02 ± 0.3 horas.

Se ha estudiado ampliamente la medición de acetaminofén en plasma y en orina para demostrar su biodisponibilidad; también se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para correlacionar los respectivos resultados. Se ha visto que un elixir preparado con sorbitol aumenta las propiedades antipiréticas y analgésicas del activo, que resultan de una mejor velocidad de disolución. La modificación de la disponibilidad del acetaminofén se puede realizar por medio de formas farmacéuticas de liberación sostenida, (10,11).

5.10 Interacciones con otros fármacos:

La salicilamida retarda la velocidad de excreción de los conjugados de acetaminofén, que está acompañada por una inhibición competitiva de la formación de conjugados de acetaminofén y salicilamida en la sangre, implicando una disponibilidad terapéutica mayor de acetaminofén libre. Se ha demostrado que el acetaminofén y la antipirina inhiben mutuamente su metabolismo en ratas y conejos, (10,11).

5.11 Toxicología:

En las dosis terapéuticas recomendadas, generalmente es bien tolerado; sin embargo, pueden ocurrir ciertas reacciones alérgicas, como erupciones cutáneas que pueden ser acompañadas de fiebre y lesiones en mucosas. El efecto secundario más serio es la necrosis hepática, potencialmente fatal. En adultos, la hepatotoxicidad puede ocurrir al ingerir una sola dosis de 10 a 15 gramos (200 a 250 mg/Kg de peso) de acetaminofén y una dosis de 25 g o más incrementa el riesgo.

La sobredosificación aguda también puede causar necrosis tubular renal y coma hipoglucémico. (10.11.2).

5.12 Dosis:

Las preparaciones oficiales incluyen generalmente tabletas (120, 350 y 500 mg), y elixir y jarabe (100 mg/ml, 120 y 150 mg/5ml). La dosis oral recomendada es de 325 a 650 mg cada cuatro horas para adultos y niños grandes; la dosis total diaria no debe exceder de 2.6 g. Para niños chicos, la dosis es de 60 a 120 mg, y la dosis total diaria no debe exceder de 1.2 g. (10,5)

6. MONOGRAFIA DEL MALEATO DE CLORFENIRAMINA :

6.1 Descripción:

El maleato de clorfeniramina es un sólido cristalino blanco e inodoro. (10)

6.2 Nombres genéricos y químicos:

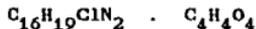
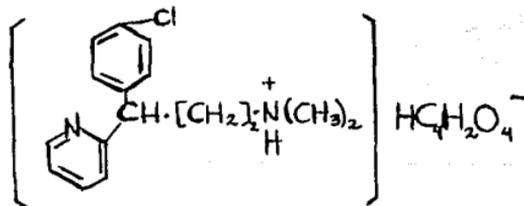
El maleato de clorfeniramina es una mezcla racémica de isómeros ópticos y es conocido por los siguientes nombres químicos;

2-piridinapropanamina, γ -(4-clorofenil)-N,N-dimetil-(2)-2-butenedioato.

2-[p-cloro- α -(2-dimetilaminoetil)bencil]piridina maleato.

También es conocida por el nombre genérico de cloro-Trimeton.

6.3 Fórmula estructural:



P.M. 390.87

6.4 Propiedades Físicas:

6.4.1. Espectro infrarrojo:

En una dispersión con nujol el maleato de clorfeniramina presenta los siguientes máximos: 3090-3010 (C-H), 2700-2400 (N⁺-H), 1705 (C=O), 1620 (C=C), 1570 (C=N), 1584 (C=C, C=N, y C-O⁻), 1359 (C-O⁻), 886 y 868 (maleato).

6.4.2. Espectro ultravioleta:

El espectro ultravioleta del maleato de clorfeniramina en metanol presenta los siguientes máximos:

Longitud de onda: (nm):	Absortividad específica: (x 10 ⁻³):
250	4.27
255	5.05
261	5.38
267	3.86
275	1.17

Y a continuación se dan los máximos en otros disolventes:

Disolvente:	Longitud de onda (nm):	Absortividad esp: (x 10 ⁻³):
0.1N NaOH (CH ₃ OH)	261	5.63
0.1N HCl (CH ₃ OH)	265	8.48
H ₂ O	261	5.76
1N NaOH (aq.)	262	5.77
1N HCl (aq.)	265	8.39
CHCl ₃	263	5.77

6.4.3. Solubilidad:

Se presentan los resultados de solubilidad del maleato de clorfeniramina en diferentes disolventes, determinados gravimétricamente o por detección al ultravioleta:

Disolvente:	Solubilidad, mg/ml a 25°C:
Etanol	330
Cloroformo	240
Sol. buffer de fosfato	190

Disolvente:	Solubilidad, mg/ml a 25°C:
0.1 N NaOH	180
Agua	160
Metanol	130
0.1 N HCl	47
Sol. salina saturada	28
Glicerina	21
Benceno	0.7
Eter de petróleo	0.1

6.4.4. Ionización y pH:

Los pKa's del maleato de clorfeniramina son los siguientes:

$$pKa_1 = 9.2$$

$$pKa_2 = 4.0$$

El pH de una solución acuosa al 2% es aproximadamente 5.

6.4.5. Punto de fusión:

Funde en el rango comprendido entre 132°C a 135°C. (1,2,10)

6.5. Estabilidad e Incompatibilidades:

Se ha reportado que se forma un precipitado al agregar iodipamida meglumina a un inyectable con maleato de clorfeniramina. Y también se pierde transparencia de un inyectable de maleato de clorfeniramina al mezclarse con cloruro de calcio, noradrenalina, tartrato ácido o fenobarbital sódico. (3)

6.6 Métodos de Análisis: (10).

- Titulación ácido-base.
- Métodos colorimétricos.
- Métodos espectrofotométricos y fluorométricos.
- Cromatografía en capa fina.

- e) Cromatografía en papel.
- f) Separación por distribución en contracorriente.
- g) Cromatografía Gas-Líquido.
- h) Cromatografía de líquidos de alta resolución, de partición y de intercambio iónico.
- i) Polarografía.

6.7. Usos: (10,11).

Es un bloqueador de la histamina (antihistamínico), antagonista de receptores H_1 . Es un antagonista farmacológico que actúa al ocupar sitios receptivos sobre la célula efectora, excluyendo las moléculas de agonista, sin comenzar ella misma una reacción.

Tiene uso valioso en el tratamiento sintomático de diversos trastornos alérgicos, en los cuales su utilidad puede atribuirse claramente a su antagonismo para la histamina.

Su débil acción atropínica reduce la rinorrea y las personas con rinitis alérgica crónica y resfriado agudo sobreañadido pueden beneficiarse en forma directa al aliviarse el componente alérgico, e indirectamente porque aumenta la resistencia de la mucosa a la infección cuando no hay reacción alérgica concomitante.

6.8. Aspectos Biofarmacéuticos: (10,11).

Se absorbe con facilidad en el tubo digestivo y en los sitios de administración parenteral. Después de la ingestión, su efecto se inicia en 15 a 30 minutos y está en su intensidad máxima una hora después, y duran aproximadamente tres a seis horas. El sitio principal de metabolización es el hígado. La transformación metabólica principal es la hidroxilación seguida de conjugación. La excreción urinaria de la sustancia inalterada es insignificante; casi toda parece como productos de degradación que se excretan en un máximo de 24 horas.

6.9. Toxicología: (10,11).

En dosis terapéuticas todos los antihistamínicos tienen efectos secundarios. Rara vez son importantes y suelen desaparecer al continuar el tratamiento, pero a veces son tan molestos que es necesario suspender la medicación. El efecto colateral más frecuente es la sedación. Los efectos secundarios que siguen en frecuencia son los que se manifiestan en el tubo digestivo, como pérdida del apetito, náuseas, vómitos, y estreñimiento o diarrea. Puede aparecer alergia cuando se administran por vía bucal, pero es más frecuente que ocurra este fenómeno por aplicación tópica.

Aunque tienen un margen de seguridad relativamente bueno, es frecuente el envenenamiento agudo con estos medicamentos. En los niños, 20 a 30 tabletas o cápsulas de los antihistamínicos de más fácil adquisición dan una dosis mortal o casi mortal.

6.10. Dosis: (10,5).

Existen los preparados de tabletas de 4 mg; de acción repetida de 8 mg y 12 mg, también existen jarabes e inyección.

Dosis oral: para adultos 2 a 4 mg cada 4 a 6 horas y para niños menores de un año 1 mg dos veces al día. Para niños de uno a cinco años, de 1 a 2 mg dos veces al día.

7. MONOGRAFIA DEL CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA :

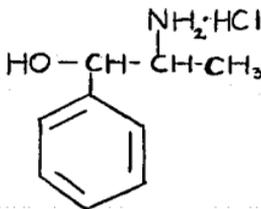
7.1. Descripción:

Polvo cristalino blanco con un olor que recuerda el del ácido benzoico crudo.

7.2. Nombres genéricos y químicos:

Propadrine, *dl*-norefedrina, rhindecon, tepanil, control, obestat, dietac, clorhidrato de α -(1-aminoetil) bencenometanol clorhidrato de α -(1-aminoetil)alcoholbencílico, clorhidrato de (+)-2-amino-fenilpropan-1-ol, 2-amino-1-fenil-1-propanol, clorhidrato de α -hidroxi- β -aminopropilbenceno, clorhidrato de 1-fenil-2-amino-1-propanol.

7.3. Fórmula estructural:



$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}$

P.M. 187.67

7.4. Propiedades Físicas:

7.4.1 Espectro infrarrojo:

En un espectro de infrarrojo obtenido con nujol entre dos placas de KBr, se encontraron las siguientes bandas características: 3368 (OH), 3303 (NH_3), 2800-2400 (NH_3), 1990 (NH_3), 1623 (NH_3 fuera del plano), 1598 (C=C), 1581 (NH_3 fuera

del plano), 1580-1491 (C=C aromático), 1450 (OH fuera del plano), 1329 (NH₃ en el plano), 1241, 1208 (OH en el plano), 1128, 1088, 1054 (C-H monosustituido en el benceno en el plano), 1031 (CO), 816 802 (NH₃), 747, 703 (C-H fuera del plano en el benceno sustituido).

7.4.2. Espectro ultravioleta:

Los espectros ultravioleta del clorhidrato de fenilpropanolamina en metanol y HCl 0.1M, a una concentración de 1 mg/ml, muestran los siguientes máximos:

Disolvente:	Longitud de onda: (nm)	Absortividad específica:
METANOL:	264.0	133.63
	258.0	179.04
	252.0	145.44
HCl 0.1M:	262.8	144.32
	257.0	185.04
	251.0	148.82

En ácido sulfúrico 0.1 N presenta los siguientes máximos:

Longitud de onda:(nm)	E _{1%} ^{1cm}
251	7.6
257	9.7
263	7.4

7.4.3. Solubilidad: (10).

Solvente:	mg/ml: (A 25°C)
Agua	1000
Metanol	1000
Isopropanol	33.3
Cloroformo	0.5
Benceno	0.5
Tetracloruro C	0.5

7.4.4 Ionización y pH:

El pKa del clorhidrato de fenilpropanolamina determinado potenciométricamente a 20°C es 9.44 ± 0.04 .

Una solución al 3% en agua, tiene un pH de 4.5 a 6.0.

7.4.5. Punto de fusión:

Los cristales de clorhidrato de fenilpropanolamina funden a 190-194°C.

7.4.6. Rotación específica:

La rotación específica, $[\alpha]_D^{25}$, del clorhidrato de fenilpropanolamina en agua es +32°. (3.4.10)

7.5. Estabilidad e Incompatibilidades:

El clorhidrato de fenilpropanolamina es un compuesto relativamente estable. Estudios de estabilidad llevados a cabo en una formulación de un jarabe descongestionante que contenía sacarosa, indicaron reducción en la concentración inicial del activo. Estudios posteriores han demostrado que el clorhidrato de fenilpropanolamina puede sufrir descomposición en la presencia de fructuosa, dextrosa y 5-(hidroximetil)-2-furaldehído, pero no la sufre con sorbitol o ácido levulínico. Se presume la probable formación de una base de Schiff durante estas condiciones de prueba. (15,10)

7.6. Métodos de Análisis: (10)

- a) Espectrofotometría ultravioleta.
- b) Análisis colorimétrico.
- c) Análisis espectrofluorimétrico.
- d) Análisis volumétrico titulométrico.
- e) Análisis Cromatográficos:
 - Cromatografía en columna.

- Cromatografía en papel
- Cromatografía en capa fina
- Cromatografía de gases
- Cromatografía de Líquidos de alta resolución.

7.7. Usos: (1,10,11)

El clorhidrato de fenilpropanolamina tiene las mismas propiedades farmacológicas de la efedrina, como son respuestas presoras por vasoconstricción, la relajación de la musculatura bronquial más sostenida, midriasis, y una potencia aproximadamente igual, excepto que produce menos estimulación en el sistema nervioso central.

También es ingrediente de varias mezclas comerciales para el tratamieto por vía bucal de la congestión nasal y de los senos, por lo general en combinación con un antihistamínico.

7.8. Aspectos Biofarmacéuticos :

En estudios realizados con muestras de orina humana se ha encontrado que aproximadamente el 90% de este activo se excreta en 24 horas y predominantemente sin cambio.

La vida media de eliminación del clorhidrato de fenilpropanolamina en el hombre ha sido reportada como de 3.9 horas y la constante de velocidad de eliminación como de 0.18 hr^{-1} . Después de la administración oral del clorhidrato de fenilpropanolamina en solución acuosa, su absorción es rápida y se completa en menos de 2.5 horas. (10,11)

7.9. Toxicología:

El insomnio es común con la medicación continua. (11)

7.10. Dosis:

Este fármaco se expende en presentaciones de cápsulas de 25 y 50 mg , y en elixir de 4 mg/ml. Dosis oral: 25 mg cada

2 a 4 horas ó 12.5mg a 50 mg cada 3 a 8 hrs; y para niños 1 mg cada 4 a 6 horas. (S,10,11)

CAPITULO III: PARTE EXPERIMENTAL:

1. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LAS FORMULACIONES:

El objetivo de este desarrollo es obtener una formulación anti-gripal, con los tres principios activos: Acetaminofén (APAP), Clorhidrato de Fenilpropanolamina (PPA), y Maleato de Clorfeniramina (CTM); en concentraciones para uso pediátrico y que no contenga alcohol ni azúcar. La restricción al uso del alcohol se dió como un requisito en formas farmacéuticas pediátricas según un acuerdo de la OMS. Y la razón de no incluir azúcar en la formulación, es la de permitir que el producto sea utilizado por niños diabéticos.

En este desarrollo se consideraron los principales aspectos de la formulación de líquidos o soluciones orales:

- Solubilidad del principio(s) activo(s). Dentro de este aspecto, se consideraron: pH, formación de complejos, y cosolubencia.

El acetaminofén es muy poco soluble en agua que es el vehiculo más barato e inocuo. Y en cambio la PPA y la CTM son muy solubles en agua. Como ayuda para resolver este problema de solubilidad del acetaminofén, Lipman y Summers (14), reportan que existe un incremento en la solubilidad del acetaminofén con el incremento en la concentración de PVP (polivinilpirrolidona), esto es debido a una complejación entre PVP y acetaminofén:

DISOLVENTE:	SOLUBILIDAD APAP (mg/ml):
Agua	18.30
Sol. al 10% PVP 17	41.59
Sol. al 10% PVP 30	41.29
Sol. al 10% PVP 90	22.45

Al acetaminofén se le puede disolver mediante cosolubencia, complejación o mediante algún otro medio en base a la literatura (14) y a la experimentación.

- Estabilidad del principio(s) activo(s).

En cuanto a este aspecto, el acetaminofén es muy estable en solución (3) y lo mismo sucede para la CTH (3). Pero acerca de la estabilidad de la PPA se reporta pérdida de ésta, en un jarabe descongestionante nasal que contiene azúcar, al realizarse estudios de estabilidad acelerada (15). Barry y colaboradores demostraron que no ocurrieron cambios en la estabilidad de PPA cuando el vehículo es sorbitol y que la sacarosa tiene un efecto mayor en la PPA a un pH de 4.5 que a un pH de 6.0.

Este problema de estabilidad de PPA se puede plantear evaluando su estabilidad mediante pruebas aceleradas a diferentes temperaturas y en base a referencias bibliográficas de artículos recientes. (15).

- Sabor y otras características organolépticas, del principio(s) activo(s) y de la forma farmacéutica.

En cuanto al sabor, el acetaminofén es muy amargo al igual que la PPA y CTH. Pero existe una gran gama de agentes edulcorantes y técnicas de enmascaramiento de sabores desagradables como el amargo. Estas técnicas se pueden comprobar mediante encuestas de sabor.

Para resolver los problemas antes planteados se decidió incluir en la formulación, en diferentes combinaciones, a los siguientes excipientes:

Como agentes cosolventes : glicerina, y sorbitol solución al 70%; polietilenglicol 8000 y PVP como agentes acomplejantes del acetaminofén. Como agentes amortiguadores se utilizaron ácido cítrico y citrato de sodio. Como agente antioxidante; metabisulfito de sodio. Como conservador; benzoato de sodio. Se utilizó como agente edulcorante sacarina sódica . amarillo No. 6 como colorante y un saborizante de naranja. Se incluyeron los 3 principios activos y se utilizó como disolvente agua purificada.

De la combinación de los excipientes anteriores surgieron 6 primeras fórmulas; de las cuales en ningún caso se obtuvo un sabor aceptable. Sólo en un caso se logró mantener la

estabilidad física y química (mezcla de glicerina y polietilenglicol 8000, fórmula 20328-36).

El procedimiento de manufactura que se siguió en este caso fue:

- Disolver en agua; los principios activos solubles en ella, PPA y CTM, el metabisulfito sódico, la sacarina sódica, el color, el citrato sódico y el ácido cítrico y la glicerina.

- Calentar la solución anterior a no más de 40°C y con agitación adicionar el polietilenglicol 8000 y enseguida el acetaminofén.

- Enfriar esta solución y adicionar el sabor.

- Ajustar el pH a 6.0 con ácido cítrico y/o citrato de sodio.

- Aforar con agua purificada.

- Filtrar y acondicionar en frascos de vidrio y polietileno de alta densidad.

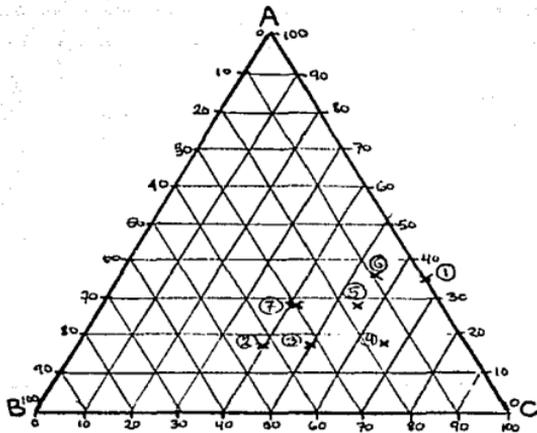
Considerando los resultados hasta aquí obtenidos, se procedió a reformular tomando en cuenta:

1. Solubilidad del acetaminofén.
2. Tratar de mejorar el sabor de las fórmulas;
3. Disminuir la viscosidad.

Experimento de solubilidad del acetaminofén en mezcla de disolventes:

Se tomaron al PEG 8000 como acomplejante por referencia de la fórmula 20328-36, y al propilenglicol por la alta solubilidad del acetaminofén en éste. Se probaron en diferentes concentraciones combinándolos con el agua que es el disolvente de las fórmulas. Se prepararon las siguientes pruebas de solubilidad que se ilustran en el diagrama de tres fases.

DIAGRAMA DE TRES FASES:



Pruebas ensayadas del diagrama:

- 1.- 34.78% A + 65.22% C
- 2.- 17.39% A + 42.39% B + 40.22% C A = PEG 8000
- 3.- 17.39% A + 32.61% B + 50.00% C
- 4.- 17.39% A + 17.39% B + 65.22% C B = Propilenglicol
- 5.- 26.09% A + 17.39% B + 56.52% C
- 6.- 34.78% A + 8.70% B + 56.52% C C = Agua
- 7.- 26.09% A + 32.61% B + 41.30% C

El punto 1.- es la solubilidad de la fórmula 20328-36. El punto 2.- tiene la mitad de cantidad de PEG 8000 pero se agregó propilenglicol para investigar el comportamiento de solubilidad en el sistema. Al punto 3.- se le agregó más agua. El punto 4.- está en la misma línea que 1.- pero tiene la mitad de PEG 8000 y además tiene propilenglicol. Como se formaron grandes cristales después de un día de refrigeración de los puntos 1.- y 4.- se pasa a la línea de 56.52% de C. Así se sugieren los puntos 5.- 6.- y 7.-.

Para realizar estas soluciones se calentó el agua a 45°C para solubilizar al PEG 8000 y al acetaminofén y se tomaron como temperaturas de observación 25°C y refrigeración.

Se obtuvieron los siguientes resultados: en el punto 1.- después de un día en refrigeración precipitó el paracetamol. En el punto 4.- precipitó el paracetamol a 25°C y en refrigeración también. En el punto 5.- se tuvo el mismo comportamiento del punto 1.-

En los puntos 2.-, 3.- 6.- y 7.- permaneció en solución el paracetamol. Se eligió el punto 6.- ya que tiene la menor concentración del componente más costoso de los tres ensayados.

Optimización del sabor:

Para mejorar el sabor, se utilizaron las fórmulas de prueba de solubilidad del acetaminofén endulzándose con sacarina y así se encontró la concentración que enmascara el sabor amargo de la manera más adecuada. También se probó adicionar cloruro de sodio

Sin embargo, al comparar las fórmulas obtenidas contra los dos principales productos de la competencia, se encontró que en el mejor de los casos sólo se superaba a una de ellas en cuanto a su sabor. Por esta razón, a pesar de que se había superado el problema de la solubilidad del paracetamol, se decidió probar otra opción.

La nueva fórmula obtenida (lote 20328-66) tuvo como disolventes únicamente agua y propilenglicol. Resultó una formulación sin problemas de solubilidad para el paracetamol y de sabor agradable. Se saborizó con el mejor sabor hasta ese momento encontrado, el cual se eligió mediante una encuesta con 30 personas.

Una vez determinado el saborizante, se ajustó la concentración de colorante amarillo No. 6 para dar un tono anaranjado adecuado.

Para continuar optimizando el sabor de la fórmula y con el objeto de disminuir lo más posible la concentración de propilenglicol se decidió realizar un mapa de solubilidad de acetaminofén en propilenglicol más agua. Con esto ya se determinó definitivamente la concentración de propilenglicol.

En estas fórmulas además se ajustó la concentración de sacarina. Se suprimió el conservador benzoato de sodio debido que la fórmula se preserva así misma por la alta concentración de propilenglicol.

Esta fórmula se metió a estabilidad acelerada de 15 días a temperatura ambiente (T.A.), 35°C, 45°C, 60°C y refrigeración. (Fórmula 20328-71).

Al final de este periodo se analizó física y químicamente con los métodos analíticos descritos más adelante.

Se encontró que la solución obtenida se mantuvo físicamente y químicamente estable, tanto en envase de vidrio como en envase de polietileno de alta densidad.

2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA FORMULACION SELECCIONADA:

Aquí se presentan resultados de pruebas de estabilidad practicadas a 3 lotes de la nueva formulación, y de acuerdo a un protocolo establecido, se obtuvieron los resultados iniciales, a un mes y a tres meses de fabricados. Este protocolo se da a continuación:

PROTOCOLO DE ESTABILIDAD

Tiempo:	Inicial:	1 mes:(1)		3 meses:					
		TAC(N)	TAC(I)	(2)	TAC(I)	TA	(3)	35°	45°
Temperatura:						(4)			
Apariencia:	X	X	X	X	X	X	X	X	
pH:	X	X	X	X	X	X	X	X	
Densidad óptica:(5)	X	X	X	X	X	X	X	X	
Pérdida de Peso:(6)							X	X	X
E CTM:	X		X		X	X	X	X	
a PPA:	X		X		X	X	X	X	
o APAP:	X		X		X	X	X	X	
Prueba de Preservación Microbiana:	X								

NOTAS:

TA : Temperatura ambiente

(N) : Gotero en posición normal.

(I) : Gotero en posición invertida

(1) El protocolo a 1 mes se aplica a muestras almacenadas del primer y segundo lote, tanto en frasco HDPE (Poliétileno de alta densidad) como en frasco de vidrio, ambos con gotero.

(2) Este protocolo a 3 meses se aplica a muestras almacenadas del primer y segundo lote, en frasco HDPE con gotero.

(3) Este protocolo a 3 meses, se aplica a muestras almacenadas del primer y segundo lote, en frascos HDPE sin gotero.

(4) Del tercer lote se analizan únicamente las muestras almacenadas en frascos HDPE sin gotero, a TA, a los 3 meses.

(5) La densidad óptica se lee a 485 nm en una solución acuosa al 5% de la Formulación.

(6) Esta prueba sólo se aplica al primer lote.

El análisis inicial incluyó; la apariencia; el pH; la densidad óptica que servirá como control de la turbidez y color; y el contenido de los tres principios activos; acetaminofén, clorhidrato de fenilpropanolamina, y maleato de clorfeniramina, que se realizan con técnicas específicas e indicativas de estabilidad por CLAR, desarrolladas y validadas para este producto.

Además se les realiza la prueba de preservación microbiana, la cual resultó satisfactoria con la cual se pretende comprobar que la fórmula se preserve por sí sola y no necesita de un conservador.

A continuación se tienen los resultados correspondientes al protocolo presentado anteriormente; no se incluyen los resultados obtenidos a un mes en frasco HDPE, con el propósito

de simplificar el reporte. Dichos resultados fueron satisfactorios.

RESULTADOS:

Primer Lote:

Envase:		Vidrio/got.	HDPE/got.	HDPE
Tiempo (Meses)	Inicial	1	3	3
Temperatura:		TACND	TACND	TA
(°C)		TACID	TACID	35
				45
Apariencia:	Líquido claro	Sin	Sin	Sin
	libre de materia	cambio	cambio	cambio
	extraña, con olor,			
	color y sabor	Sin	Sin	Sin
	característico a	cambio	cambio	cambio
	naranja.			
				A 45•
			color naranja obscuro.	
pH:	5.52	5.52	5.56	5.57
(4.5-6.5)	5.49	5.50	5.56	5.60
				5.64
Densidad	0.260	0.259	0.255	0.251
óptica:	0.261	0.262	0.252	0.258
				0.260
Pérdida				0.32
de				0.98
Peso:				2.30
E CTM:	103.8	99.6 (I)	103.8(I)	102.4
n (90-110)				102.6
s				96.0
a PPA:	102.1	103 (I)	100.7(I)	100.9
y (90-110)				100.3
o				93.7
APAP:	104.4	100.6 (I)	103.9(I)	103.1
z (90-110)				105.2
				105.8

Prueba de preservación

Microbiana: Pasa la prueba

RESULTADOS:

Segundo Lote:

Tiempo: (Meses)	HDPE/gotero	Vidrio/got.	HDPE/got.	HDPE
Inicial	1	1	3	3
Temperatura: (C.C)	TAC(N)	TAC(N)	TAC(N)	TA
	TAC(I)	TAC(I)	TAC(I)	35
				45
Apariencia:	Líquido claro	Sin	Sin	Sin
	libre de materia	cambio	cambio	cambio
	extraña, con olor			
	color y sabor	Sin	Sin	Sin
	característico a	cambio	cambio	cambio
	nararanja.	A 45°C, el	color es	naranja
				oscuro
pH:	5.49	5.31	5.33	5.43
(4.5-6.5)		5.32	5.31	5.42
				5.45
				5.57
Densidad	0.276	0.267	0.268	0.255
óptica:		0.270	0.270	0.259
				0.262
				0.282
E CTM:	101.8			
n (90-110%)		99.4	98.8	101.4
s				101.2
a PPA:	101.4			
y (90-110%)		103.8	102.6	101.2
o				100.7
APAP:	102.2			
% (90-110%)		100.1	101.9	104.8
				102.7
				102.4
Prueba de Preservación Microbiana:	Pasa la prueba			

RESULTADOS:

Tercer Lote:		
Tiempo:		HDPE
(Meses)	Inicial	3
Temperatura:		TA
(°C)		
Apariencia:	Líquido claro, libre de materia extraña, con olor color y sabor característico a naranja.	Sin cambio
pH:	5.51	5.46
(4.5-6.5)		
Densidad	0.344	0.264
óptica:		
E CTH:	104.4	103.8
n (90-110%)		
s		
a PPA:	102.2	102.1
y (90-110%)		
o		
APAP:	102.3	103.2
% (90-110%)		
Prueba		
de		
Preservación		
Microbiana	Pasa la Prueba	

Se puede observar en los resultados que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en HDPE con gotero y en vidrio con gotero.

A los tres meses se observa una disminución en los contenidos de PPA y CTH en los frascos HDPE a 45°C (sin llegar

a estar fuera de los límites especificados); el acetaminofén permanece estable.

A partir de estos resultados, se puede estimar una primera aproximación de fecha de caducidad del producto de 1 año.

Con esto se concluye el trabajo de formulación, pero se siguió estudiando su estabilidad. Hasta el momento se ha comprobado una fecha de caducidad de 24 meses a T.A. y el estudio prosigue.

SEGUNDA PARTE

DESARROLLO Y VALIDACION DE DOS METODOS ANALITICOS POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR) PARA LA
CUANTIFICACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA FORMA
FARMACEUTICA.

CAPITULO IV: GENERALIDADES:

1. DESCRIPCION DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR):

Actualmente la cromatografía es una de las técnicas de separación más utilizadas en la química analítica. Específicamente la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) permite obtener separaciones rápidas y cuantificación inmediata, mediante el uso de detectores de alta sensibilidad, además de un alto grado de automatización para análisis rutinarios.

En la actualidad los métodos cromatográficos han ido adquiriendo mayor relevancia como métodos de análisis debido a las ventajas que presentan frente a otros métodos analíticos ya existentes.

El término de cromatografía de líquidos se aplica a cualquier proceso cromatográfico de separación, en el que la fase móvil es un líquido, como en la cromatografía en columna, en papel, en capa fina y la cromatografía de líquidos de alta resolución. La principal diferencia entre ésta última y las demás cromatografías, consiste en la optimización de instrumentos, materiales y técnicas utilizadas, entre otros:

- Columnas reutilizables de diámetro interno reducido, rellenas con la fase estacionaria.
- Flujo controlado de la fase móvil.
- Instrumentación automática.
- Introducción precisa de la muestra en pequeña cantidad.
- Detectores continuos, sensibles a pequeños cambios en la composición de la fase móvil.
- Análisis rápidos.
- Alta resolución.

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso, un líquido impregnado en esferas de vidrio (u otros materiales inertes) de diámetro muy reducido, o más comúnmente una sustancia enlazada químicamente a partículas de gel de sílice;

ésta molécula terminal puede ser una cadena alifática, un anillo aromático, una amina, etc.

La versatilidad de la CLAR está sustentada en gran medida por el hecho de que la fase móvil no es inerte, sino que la separación de componentes de una mezcla, ocurre por interacciones de la fase estacionaria y la móvil. Este hecho permite perfeccionar una separación mediante cambios en la composición de la fase móvil, ya sea durante la elución de una muestra (elución por gradiente), o manteniéndola constante (elución isocrática) y adicionando a la fase móvil sustancias que le proporcionen propiedades especiales (cromatografía de pares iónicos y cromatografía de supresión de ionización).

La polaridad relativa entre las dos fases da lugar a otra clasificación de CLAR:

-Fase normal: cuando la fase estacionaria es de naturaleza polar (sílice, alúmina, o fases enlazadas con un grupo terminal OH, NH₂, CN, etc.) y la fase móvil es un líquido o una mezcla de líquidos no polares como el hexano, tetrahidrofurano, n-heptano, etc.

-Fase inversa: la fase estacionaria es no polar, puede ser una cadena alifática, un anillo aromático, una amina, etc., enlazados químicamente a partículas de gel de sílice. La fase móvil es de naturaleza polar; agua, metanol, acetonitrilo, soluciones acuosas amortiguadoras. En este caso los compuestos no polares quedan retenidos por la fase estacionaria más tiempo que los componentes polares. Esta modalidad de cromatografía es actualmente la más utilizada de las dos, porque los disolventes polares usados son más accesibles, fáciles de manejar y de menor costo.

De cualquier manera la fase móvil, polar o no polar, debe tener ciertas características que permitan emplearla en CLAR:

- Debe disolver a la muestra.
- Ser libre de contaminantes y gases disueltos.
- Debe tener baja viscosidad.
- No debe alterar la composición de la columna
- No debe interferir con el detector.

1.1. Características de los equipos para CLAR:

El equipo para CLAR consta básicamente de:

- a) Un recipiente que contiene a la fase móvil.
- b) Una bomba que impulsa a la fase móvil a través de todo el sistema de un modo controlable.
- c) Un mecanismo para introducir la muestra de una manera precisa.
- d) La fase estacionaria contenida en un tubo de diámetro reducido; la columna.
- e) Un aditamento que detecta los compuestos que salen de la columna como una señal que permite una evaluación cuantitativa, y determina que separación ha tenido lugar.
- f) Y un registrador y/o integrador que provee la información cualitativa y cuantitativa de los resultados ya sea en forma de cromatogramas (curva de respuesta vs tiempo) y/o cálculo de áreas.

1.1.1 Recipientes y bombas:

Los recipientes usados en CLAR para contener la fase móvil tienen por lo general más de 500 ml de capacidad para que sean prácticos; algunos equipos tienen recipientes especiales para degasificar su fase móvil y calentarla cuando se hacen análisis a temperatura controlada.

En general se considera que uno de los componentes más importantes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución es la bomba, ya que es la que impulsa a la fase móvil.

1.1.2. Inyector:

Para introducir la muestra en el sistema, la principal consideración a tener en cuenta es disponer de una zona de poco volumen que sea completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra.

1.1.3. Columnas:

La columna es un tubo, generalmente de acero inoxidable que está relleno con la fase estacionaria. Existen varios tipos de empaque:

- Partículas de centro sólido con recubrimiento pelicular o poroso, de sílice generalmente.

- Partículas completamente porosas de sílice, que pueden tener enlazadas químicamente a su superficie diferentes grupos funcionales o polímeros.

Normalmente las partículas de empaque tienen un diámetro entre 5 y 20 micras y la columna tiene un diámetro interno entre 2 y 6 mm por una longitud entre 10 y 50 cm.

1.1.4. Detectores y registradores:

Una parte importante del cromatógrafo de líquidos es el detector, el cual debe responder continuamente a cambios de la composición del efluente de la columna. Principalmente se usan en CLAR los detectores ópticos. Las variaciones en la intensidad de luz causadas por la absorción UV-visible, fluorescencia o índice de refracción resultantes de la interferencia encontrada al pasar los componentes de la muestra a través de la celda, son monitoreados como cambios de voltaje los cuales son registrados en un integrador.

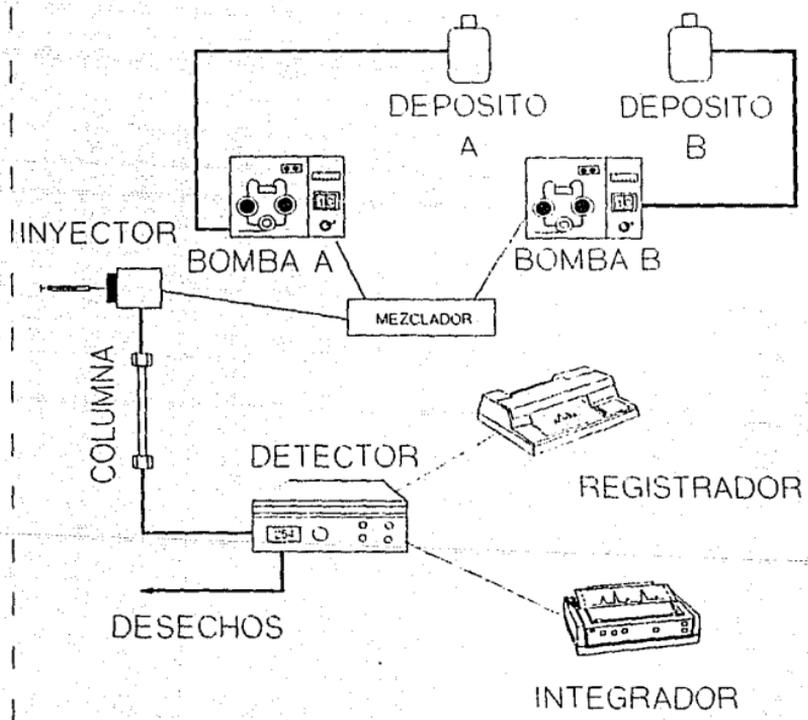
El detector en CLAR más común es de absorción UV-visible capaz de monitorear en el intervalo de 190 a 800 nm.

La respuesta del detector se traduce como un pico que dibuja un graficador; la altura o el área de ese pico es función de la concentración del compuesto que pasó por el detector.

Actualmente los integradores electrónicos obtienen el área de los picos, controlan las condiciones del análisis y generan reportes para cada inyección que se hace.

El diagrama siguiente ilustra la configuración de un sistema de CLAR con capacidad para la elución por gradiente. (23,24,25)

ESQUEMA DE LA CROMATOGRAFIA EN FASE LIQUIDA

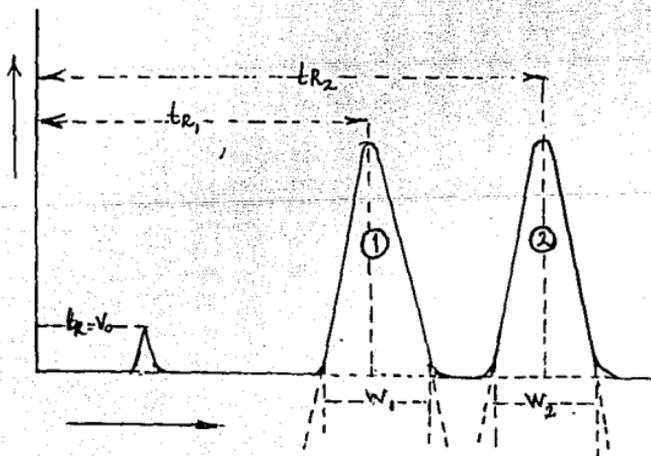


2. CONCEPTOS TEÓRICOS :

2.1. Tiempo de retención:

Cada compuesto separado abandona la columna como una banda simétrica y se registra como pico en forma de campana de Gauss; estos picos emergen de la columna en un tiempo determinado, característico de cada compuesto en ciertas condiciones, que puede ser usado para identificar al compuesto. A este lapso transcurrido desde la inyección hasta la aparición del máximo del pico se le conoce como tiempo de retención .

La diferencia entre los tiempos de retención de dos picos advacentes muestra relativamente la separación de los dos compuestos. Esta se define mejor si se considera también el ancho del pico en su base . Trazando tangentes a cada lado del pico y extendiéndolas hasta la línea base o señal cero del detector en la gráfica:



2.2. Resolución:

La resolución muestra el grado de separación entre dos picos y es el cociente entre la diferencia de sus tiempos de retención y el promedio del ancho de sus bases, en unidades de tiempo.

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 (W_{t1} + W_{t2})}$$

Donde:

W_{t1} = ancho del pico del compuesto 1 en su base

W_{t2} = ancho del pico del compuesto 2 en su base

t_{r1} = tiempo de retención del compuesto 1

t_{r2} = tiempo de retención del compuesto 2

R_s = resolución.

Cuando $R_s = 1.0$ el área de contaminación es del 2% del área total bajo las curvas, suponiendo que ambos constituyentes se encuentren en la misma concentración. Para reducir la contaminación al 0.1 %, la resolución deberá ser de 1.5 o más.

Para el mismo empaque, la resolución puede mejorarse alargando el tamaño de la columna o reduciendo el tamaño de partícula del empaque; así aumentará el número de platos teóricos.

2.3. Platos teóricos:

La teoría de los platos teóricos considera que una columna está compuesta por una serie de capas horizontales y contiguas separadas, denominadas platos teóricos; en cada plato tiene lugar el equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El número de platos teóricos en una columna es una medida de su eficiencia y, usando el ancho de un pico en el cromatograma así como el tiempo de retención, se calcula con la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{W_t} \right]^2$$

Donde:

N = número de platos teóricos
tr = tiempo de retención
Wt = ancho del pico en la base, en tiempo.

El valor de N es proporcional a la longitud de la columna L, y de aquí se puede calcular al espesor de cada plato, o como se conoce mejor, la altura equivalente a un plato teórico:

$$AEPT = L/N$$

Donde:

L = longitud de la columna
N = número de platos teóricos
AEPT = altura equivalente a un plato teórico

Valores de N grandes y valores de AEPT pequeños indican una columna eficiente.

2.4. Factor de capacidad y factor de separación:

El factor de capacidad es la medida de la eficiencia de la columna para separar un compuesto del disolvente con que fue inyectado.

$$k = \frac{tr - to}{to}$$

Donde;

k = factor de capacidad
tr = tiempo de retención
to = tr del disolvente o tiempo muerto

El factor de separación nos relaciona los factores de capacidad de dos compuestos diferentes para dar una idea de su separación.

$$\alpha = \frac{k1}{k2}$$

Donde:

α = factor de separación

k_1 y k_2 = factores de capacidad de los compuestos 1 y 2

Un valor de $\alpha = 1$ indica que no hay separación.

α se puede mejorar variando la composición de la fase móvil, o cambiando la fase estacionaria. Del mismo modo k se puede aumentar disminuyendo la fuerza eluyente de la fase móvil. No se aumenta usando columnas más largas, o disminuyendo el tamaño de partícula de la fase estacionaria. (24,25)

3. DESARROLLO DE TECNICAS ANALITICAS:

El propósito de un método analítico es determinar la cantidad de una sustancia en una muestra dada, de un modo preciso, exacto y específico. Para poder efectuar el desarrollo de un método analítico para un principio activo contenido en un medicamento, es necesario, en primer término, realizar una búsqueda bibliográfica con el fin de conocer las técnicas que ya existen para el efecto y así seleccionar aquella que convenga de acuerdo a los recursos disponibles; de este modo, se podrá escoger desde una técnica elemental como la volumetría, hasta una sofisticada como la cromatografía de líquidos de alta resolución. En el caso de que el compuesto sea totalmente nuevo y no exista información al respecto, el desarrollo se deberá hacer con las técnicas deseadas y/o disponibles, teniendo en cuenta las propiedades del compuesto. Para escoger el método, se deben conocer las características fisicoquímicas del fármaco, como su solubilidad, estabilidad, pK y punto de ebullición, con el fin de poder realizar su separación de los excipientes que lo acompañan o de otros principios activos que puedan interferir en el análisis, así como de los posibles productos de degradación. En algunos casos se podrá hacer una simple dilución, pero en otros se necesitará realizar extracciones con fases inmiscibles, teniendo en cuenta el coeficiente de reparto, o separaciones cromatográficas que van desde la capa fina hasta la cromatografía de gases o líquidos, y en este caso al efectuar la separación, se puede lograr la cuantificación al mismo tiempo. Si el fármaco presenta un producto de degradación que no haya sido aislado en el método de separación, se obtendrán resultados falsos. Por este motivo se deben conseguir en lo posible, el o los productos de degradación del activo que se analiza, y así asegurar la separación por medio de estos estándares.

Una vez que se tiene la separación adecuada, se procede a la validación del método desarrollado.

4. VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS:

La comprobación y verificación documentada de la efectividad y reproducibilidad de una técnica, una operación o un proceso, recibe el nombre de Validación. También se describe como el conjunto de pruebas que constituyen la evaluación crítica de la confiabilidad y reproducibilidad de toda operación o proceso.

La validación de mediciones analíticas es necesaria cuando se realizan pruebas químicas en muestras de materiales, para luego aplicar las medidas adecuadas en la totalidad del material. Las mediciones no son válidas hasta que se evalúan los parámetros de trabajo del proceso que produjo esa medición.

La primera tarea utilizada en la evaluación de cualquier método químico de análisis es determinar las fuentes de variación de los resultados, para entonces minimizar la variabilidad total, buscando y controlando a los contribuyentes de ella en el proceso de análisis.

Puede existir variabilidad en cualesquiera de los siguientes pasos de medición en un laboratorio:

- En el material por ser analizado.
- En los materiales utilizados en el análisis, incluyendo reactivos.
- En el equipo, instrumentos o materiales para calibración.
- Por los químicos analistas.
- Por los factores ambientales, y
- En los instrumentos o aparatos en sí.

Aunque estos factores no son definitivos, describen las clases generales de fuentes de variación que deben ser consideradas. Un esquema de validación de un método analítico puede comprender los siguientes pasos; linealidad del sistema, precisión del sistema, tolerancia, especificidad, exactitud del método, reproducibilidad o precisión del método y estabilidad de la muestra. (26,27).

CAPITULO V: PARTE EXPERIMENTAL:

1. DESARROLLO DE LOS METODOS ANALITICOS:

En este desarrollo se pretendió que el método para analizar paracetamol, clorhidrato de fenilpropanolamina y maleato de clorfeniramina fuera confiable tanto para estudios de estabilidad como para control de calidad, además de que fuera lo más sencillo posible y al menor costo. Al considerar las propiedades fisicoquímicas de los tres fármacos, principalmente; absorción al espectro UV, pKa y solubilidad; y en base a métodos ya reportados en la literatura; se trató de obtener una técnica que permitiera el análisis de los tres activos en una sola corrida por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y sin tener que realizar extracciones para separarlos previamente a su inyección.

Se encontraron métodos que analizaban conjuntamente a los tres activos por CLAR, utilizando más de tres fases móviles en la misma corrida. Sin embargo no fue posible probarlos ya que no se contaba con un equipo adecuado para hacer el cambio de fases móviles. (16,17,18)

Se revisaron métodos ya existentes probados para otros productos que contenían también a alguno o algunos de los activos; se encontró un método para analizar PPA y CTM simultáneamente en jarabes, utilizando una columna fenil y una fase móvil de hexanosulfónico 0.01 M/acetoneitrilo/ac. acético.

Pero al probar este método no se logró la separación simultánea y adecuada de paracetamol, PPA y CTM.

Así mismo se encontraron otros métodos que permiten analizar al paracetamol en columna fenil con fase móvil de metanol/agua, y a la PPA y CTM en columna C18. Se probó analizar en la misma corrida al paracetamol, PPA y CTM en las condiciones mencionadas pero no se lograron separaciones adecuadas.

También se revisó información sobre las sustancias modificadoras de fase, utilizadas para técnicas con aminas muy básicas como son la PPA y la CTM. (21) Se probaron estos

modificadores de fase, con columnas C18 y fenil, para intentar separar y cuantificar en la misma corrida a los tres activos, sin obtener buenos resultados debido a que el paracetamol se encuentra en una concentración mucho mayor que la PPA y la CTM, y no se pudo cuantificar a los tres adecuadamente.

Se encontró un método para analizar únicamente paracetamol en soluciones, que utiliza como fase móvil metanol/agua y una columna fenil. Este método se probó y resultó muy bueno para analizar al paracetamol sólo, dado que la PPA y CTM, por su baja concentración respecto al paracetamol, no salen en el cromatograma, ni interfieren.

Paralelamente se revisó otra información de una técnica utilizada para un jarabe que contenía paracetamol, fenilpropanolamina, clorfeniramina y dextrometorfán, la cual utiliza una columna μ Porasil y una fase móvil de metanol/fosfato dibásico de amonio 0.01 M a un pH de 7.8. (19)

La columna μ Porasil es una columna de sílica gel sin recubrimiento y es un soporte efectivo de fase inversa para separaciones de antihistamínicos, rápidas e isocráticas, con fases simples como buffers acuosos y fases orgánicas. Con esta columna, que tiene una máxima concentración de grupos silanol en la superficie se tienen volúmenes de retención más bajos y picos más simétricos que con otro tipo de columnas de fase inversa. Se logran además, análisis reproducibles y una buena vida de la columna. (22,19,20). Se probó este método y resultó una separación adecuada de los tres activos, pero el paracetamol no se logró separar completamente de los excipientes. Sin embargo, este método resultó muy bueno para cuantificar a la PPA y CTM. En base a los resultados anteriores se desarrolló un sistema únicamente para analizar paracetamol y otro para analizar simultáneamente PPA y CTM.

1.1. Método desarrollado para Paracetamol:

PARAMETROS CROMATOGRAFICOS:

1. Instrumento	Cromatógrafo de Líquidos
2. Columna	μ Bondapak Fenil 30 cm x 3.9 mm D.I.
3. Detector	UV fijo a 254 nm.
4. Fase Móvil	Metanol/Agua 35:65
5. Flujo	1.5 ml/min
6. Estándar Interno	Cafeína
7. Tiempos de retención aproximados	Paracetamol 3 min Cafeína 6 min

REACTIVOS, SOLUCIONES ESTANDAR Y PREPARACION DE LA MUESTRA

- Metanol para cromatografía.
- Agua destilada.
- Fase móvil:

* Mezclar metanol/agua en una proporción 35:65.

* Filtrar la solución anterior a través de un filtro de 0.22 μ .

* Degasificar usando vacío y una agitación lenta (15 min).

- Solución Estándar Interno:

Pesar exactamente cerca de 250 mg de cafeína estándar de referencia y transferir cuantitativamente a un matríz volumétrico de 100 ml. Anotar el peso. Pi. Disolver y diluir a volumen con metanol/agua 1:1.

- Solución Estándar de Paracetamol:

Pesar exactamente cerca de 40 mg de paracetamol estándar de referencia y transferir cuantitativamente a un matríz

volumétrico de 50 ml. Anotar el peso, Ps. Disolver y diluir a volumen con metanol/agua 1:1.

- Solución Estándar Factor Respuesta:

Transferir 5.0 ml de la solución estándar de paracetamol a un matríz volumétrico de 50 ml y agregar 5.0 ml de solución estándar interno. Diluir a volumen con metanol/agua 1:1.

- Solución de la muestra:

Transferir 2.0 ml de la solución oral pediátrica a un matríz volumétrico de 100 ml y enjuagar la pipeta con metanol/agua 1:1, disolver y diluir a volumen con ésta última. Transferir 5.0 ml de esta solución a un matríz volumétrico de 100 ml, adicionar 10.0 ml de la solución estándar interno y diluir a volumen con metanol/agua 1:1. Inyectar 20 μ l al cromatógrafo.

CALCULOS:

Factor Respuesta; se utilizan los datos obtenidos de las soluciones estándar del factor respuesta:

$$K = \frac{APAP}{CAF.} \times \frac{P_i}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{50}{P_s} \times \frac{50}{5}$$

$$K = \frac{APAP}{CAF.} \times \frac{P_i}{P_s} \times 0.5$$

$$\bar{K} = K/n$$

Donde:

APAP = área del pico correspondiente al paracetamol.

CAF. = área del pico correspondiente a la cafeína.

P_i = peso del estándar interno cafeína.

P_s = peso del estándar de referencia paracetamol.

K = factor respuesta promedio.

K = factor respuesta.

n = número de estándares

Quantificación de la muestra; mg de paracetamol/ml; se emplean los datos obtenidos de las soluciones de las muestras y el factor respuesta (K).

$$\text{mg/ml} = 1/K \times \frac{\text{APAP}}{\text{CAF}} \times \frac{P_i}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{100}{V} \times \frac{100}{5}$$

$$\text{mg/ml} = 1/K \times \frac{\text{APAP}}{\text{CAF}} \times \frac{P_i}{V} \times 2.0$$

Donde: V = volumen de la muestra.

1.2. Método desarrollado para Clorhidrato de Fenilpropanolamina (PPA) y Maleato de Clorfeniramina (CTM):

PARAMETROS CROMATOGRAFICOS:

1. Instrumento	Cromatógrafo de Líquidos
2. Columna	µPorasil de 30 cm x 3.9mm
3. Detector	UV fijo a 254 nm
4. Fase Móvil	Metanol/Fosfato Dibásico de amonio 0.01 M pH = 7.0 (75:25).
5. Flujo	1.5 ml/min
6. Estandar Interno	Maleato de Pírilamina
7. Tiempos de retención aprox.	PPA 7 min Pírilamina 10 min CTM 15 min

REACTIVOS, SOLUCIONES ESTANDAR Y PREPARACION DE LA MUESTRA:

- Fosfato Dibásico de amonio solución 0.01 M en agua.
- Metanol para cromatografía
- Fase móvil:
 - * Mezclar la solución acuosa de fosfato dibásico de amonio 0.01 M y el metanol en la proporción 25:75. Ajustar el pH a 7.0.

* Filtrar la solución anterior a través de un filtro de 0.22μ .

* Degasificar la fase móvil utilizando vacío y agitación.

- Solución de Estándar Interno:

Pesar exactamente cerca de 62.5 mg de maleato de pirilamina estándar de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y aforar con metanol/agua 75:25. Tomar de esta solución 2.0 ml y transferirlos a otro matraz volumétrico de 50 ml, diluir a volumen con metanol/agua 75:25.

- Solución Mezcla de Estándares:

Pesar con exactitud, aproximadamente 156.5 mg de PPA y 25 mg de CTM y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml. Disolver y llevar a volumen con metanol/agua 75:25.

- Solución del Factor Respuesta:

Transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, 5.0 ml de solución mezcla de estándares y 5.0 ml de solución de estándar interno, diluir y aforar con metanol/agua 75:25.

- Solución de la muestra:

Transferir 5.0 ml de la solución oral pediátrica a un matraz volumétrico de 25 ml, enjuagar la pipeta con metanol/agua 75:25, adicionar 5.0 ml de la solución de estándar interno y aforar con metanol/agua 75:25. Inyectar 20 μ l al cromatógrafo.

CALCULOS:

Factor Respuesta: se utilizan los datos obtenidos de la solución del factor respuesta:

PPA:

$$K = \frac{PPA}{P} \times \frac{P_i}{25} \times \frac{2}{50} \times \frac{5}{25} \times \frac{50}{P_{ppa}} \times \frac{25}{5}$$

$$K = \frac{PPA}{P} \times \frac{P_i}{P_{ppa}} \times 0.08$$

$$\bar{K} = K/n$$

Donde:

K = factor respuesta

PPA = área del pico correspondiente a PPA

P = área del pico correspondiente a pirilamina

Pi = Peso de pirilamina (estándar interno)

P_{ppa} = Peso de PPA estándar de referencia.

n = número de inyecciones de estándares.

K = factor respuesta promedio.

CTM:

$$K = \frac{CTM}{P} \times \frac{P_i}{P_{ctm}} \times 0.08 \quad \bar{K} = K/n$$

Donde:

CTM = área del pico correspondiente a CTM

P_{ctm} = Peso de CTM estándar de referencia

Quantificación de la muestra; se utilizan los datos obtenidos de las soluciones de las muestras.

mg de PPA/ml:

$$mg/ml = 1/\bar{K} \times \frac{PPA}{P} \times \frac{P_i}{25} \times \frac{2}{50} \times \frac{5}{25} \times \frac{25}{V}$$

$$mg/ml = 1/\bar{K} \times \frac{PPA}{P} \times \frac{P_i}{V} \times 0.008$$

Donde; V = volumen de muestra.

mg de CTM/ml:

$$mg/ml = 1/\bar{K} \times \frac{CTM}{P} \times \frac{P_i}{V} \times 0.008$$

Con objeto de optimizar los parámetros cromatográficos, así como observar la influencia de los mismos en el factor de resolución y en el tiempo de retención, se realiza la prueba de Tolerancia, en los dos métodos analíticos desarrollados. Para

esto se emplearon muestras de un lote que permaneció a T.A. y 70°C durante 14 días. Se utilizaron columnas con diferente número de platos teóricos, se modificó la proporción de fase móvil, el flujo y el pH, alrededor de los valores establecidos durante el desarrollo de los métodos. Se observaron las variaciones que se produjeron en los tiempos de retención y por lo tanto en la resolución de las sustancias de interés. Ver tablas 1, 2, 3, y 4.

En cuanto al número de platos teóricos, conforme se emplean columnas de mayor vida media se mejora la resolución del producto(s) de interés con respecto a los excipientes o productos de degradación y al estándar interno. Al incrementar la proporción de fase orgánica disminuyen los factores de resolución; lo mismo se observa al aumentar el flujo de la fase móvil.

Tabla No.1: NUMERO DE PLATOS TEORICOS (NPT)

Método para Paracetamol:

a) Muestras a T.A.:

NPT	FACTOR DE RESOLUCION	
	A/C	
576	3.82	
1911	6.51	
1453	5.81	

b) Muestras a 70°:

NPT	FACTOR DE RESOLUCION	
	A/C	
576	3.97	
1911	6.78	
1453	5.39	

NPT* Evaluados con Cafeína.

Nota: A = Paracetamol C = Cafeína

Método para PPA y CTN:

a) Muestras a T.A.:

NPT*	FACTOR DE RESOLUCION		
	E/PPA	PPA/P	P/CTM
1411	3.65	3.64	4.20
2341	6.07	3.57	5.31

b) Muestras a 70°C:

NPT*	FACTOR DE RESOLUCION		
	E/PPA	PPA/P	P/CTM
1491	3.56	3.59	4.18
1949	4.59	3.44	5.09

NPT* Evaluados con Pirilamina. Nota: P = pirilamina.

E = excipiente o producto de degradación.

Tabla No. 2: PROPORCION DE FASE MOVIL

Método para Paracetamol:

a) Muestras a T.A.:

METANOL:AGUA	FACTOR DE RESOLUCION A/C
30:70	9.32
35:65	6.51
40:60	6.29

b) Muestras a 70°C:

METANOL:AGUA	FACTOR DE RESOLUCION A/C
30:70	8.65
35:65	6.78
40:60	5.68

Método para PPA y CTM :

a) Muestras a T.A.:

METANOL:BUFFER	FACTOR DE RESOLUCION		
	E/PPA	PPA/P	P/CTM
70:30	5.26	4.94	4.66
75:25	6.07	3.57	5.31
80:20	6.53	2.46	5.15

b) Muestras a 70°C:

METANOL:BUFFER	FACTOR DE RESOLUCION		
	E/PPA	PPA/P	P/CTM
70:30	5.08	3.66	4.68
75:25	4.59	3.44	5.09
80:20	5.26	2.50	5.50

Tabla No. 3: FLUJO:

Método para Paracetamol:

a) Muestras a T.A.:

ml/min:	FACTOR DE RESOLUCION:
	A/C
1.0	7.64
1.5	6.51
2.0	6.74

b) Muestras a 70°C:

ml/min:	FACTOR DE RESOLUCION:
	A/C
1.0	8.19
1.5	6.78
2.0	7.00

Método para PPA y CTH:

a) Muestras a T.A.:

ml/min:	FACTOR DE RESOLUCION:		
	E/PPA	PPA/P	P/CTH
1.0	6.37	3.53	5.33
1.5	6.07	3.57	5.31
2.0	6.12	2.96	4.59

b) Muestras a 70°C:

ml/min:	FACTOR DE RESOLUCION:		
	E/PPA	PPA/P	P/CTH
1.0	5.82	3.65	5.24
1.5	4.59	3.44	5.09
2.0	4.81	3.15	4.71

Tabla No. 4: pH DE LA FASE MOVIL:

Método para PPA y CTM:

a) Muestras a T.A.:

pH:	FACTOR DE RESOLUCION:		
	E/PPA	PPA/P	P/CTM
6.5	5.43	4.32	4.89
7.0	6.07	3.57	5.31
7.5	6.09	2.60	4.97

b) Muestras a 70°C:

pH:	FACTOR DE RESOLUCION:		
	E/PPA	PPA/P	P/CTM
6.5	2.97	5.15	4.86
7.0	4.59	3.44	5.09
7.5	4.81	2.39	4.86

En base a los resultados antes expuestos, se puede establecer que los dos sistemas propuestos son tolerantes a ciertos cambios en la composición de la fase móvil, pH y flujo a partir del punto central, ya que la resolución de los picos de interés es mayor a 2.0 en todos los casos del método para PPA y CTM, y mayor a 5.0 en todos los casos del método para Paracetamol. Además se decidió que los puntos centrales fueran los presentados, ya que en estos puntos centrales se conjugaba un factor de resolución óptimo así como un tiempo de retención óptimo también.

Con respecto al número de platos teóricos, se recomienda un mínimo de 576 para el método del paracetamol, evaluados respecto a la cafeína; y un mínimo de 1411 para el método de PPA y CTM, evaluados respecto a pirilamina; para asegurar la adecuada resolución de los picos de interés; con un menor número de platos teóricos no se asegura un factor de resolución dentro de los límites establecidos antes mencionados.

2. VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS:

Todas las muestras de producto terminado y sus placebos fueron acondicionadas en frascos de polietileno de alta densidad y en vidrio ámbar tipo III.

Para efectuar la validación de los dos métodos analíticos desarrollados se realizaron los siguientes experimentos:

1. Especificidad
2. Linealidad del sistema
3. Precisión del sistema
4. Efecto del tamaño de la muestra
5. Precisión del método
6. Exactitud del método
7. Estabilidad de la muestra

2.1 Validación del Método para Paracetamol:

2.1.1. Especificidad:

Es la capacidad que tiene un sistema cromatográfico de resolver del pico de interés los otros componentes que den señal en el detector (productos de degradación, excipientes, otros activos), es decir, es el grado en que la medición se debe sólo a la sustancia por determinar y no a otras que pueden estar presentes en el material a analizar.

En el caso de que esta prueba se aplique a una técnica que vaya a ser utilizada para estudios de estabilidad, se hace un estudio de las sustancias que pueden presentarse durante el periodo de almacenamiento del producto en condiciones normales o específicas de temperatura, luz, humedad, pH, agentes oxidantes, etc. durante un periodo determinado.

Se obtuvieron cromatogramas de las muestras de producto terminado, placebo y soluciones estándar que a continuación se enlistan, siendo analizadas bajo las condiciones cromatográficas mencionadas para el método de paracetamol.

1. Estándares:

- a) Paracetamol (Figura 1)
- b) Cafeína (Figura 2, estándar interno)
- c) Factor respuesta (Figura 3)

2. Producto terminado, almacenado a:

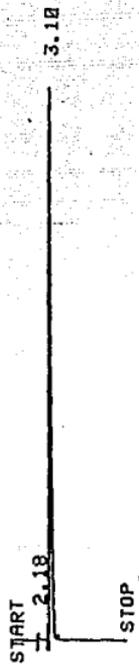
- a) Temperatura ambiente, (cromatograma con estándar interno, Figura 4).
- b) Temperatura ambiente, (cromatograma sin estándar interno, Figura 5).
- c) 70°C durante 14 días, (cromatograma sin estándar interno, Figura 6).

3. Placebo de Paracetamol, almacenado a :

- a) Temperatura ambiente, (cromatograma sin estándar interno, Figura 7).
- b) 70°C durante 14 días, (cromatograma sin estándar interno, Figura 8).

Observando los cromatogramas que se muestran en las figuras 1 a 8, se concluye que no hay sustancias que interfieran con los picos de interés, ya que en los cromatogramas correspondientes a los placebos y a producto terminado no se observan picos en los mismos tiempos de retención del paracetamol y cafeína, por lo tanto el método es específico bajo el sistema cromatográfico establecido.

Figura No. 1



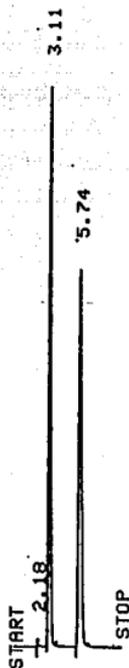
Estándar de Paracetamol

Figura No. 2



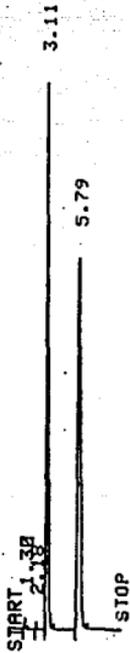
Estándar de Cafeína

Figura No. 3



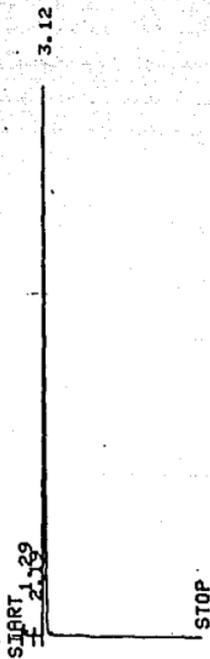
Factor Respuesta

Figura No. 4



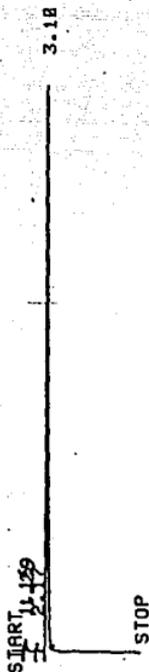
Producto terminado a T.A.
con estándar interno.

Figura No. 5



Producto terminado a T.A.
sin estándar interno.

Figura No. 6



Producto terminado a 70°C
sin estándar interno.

Figura No. 7

START 1.31
2.17
STOP.

Placebo de Paracetamol a T.A.
sin estándar interno.

Figura No. 8

START
213
STOP

Placebo de Acetaminofén a 70°C
sin estándar interno

2.1.2. Linealidad del sistema:

Con esta prueba, se pretende demostrar que el sistema cromatográfico origina una respuesta lineal dentro de un rango de concentraciones del principio activo, en cuyo punto intermedio se encuentra el 100% de la cantidad a cuantificar por el método de análisis, es decir, mide el grado en el que una curva de calibración se aproxima a una línea recta.

Esta prueba se realiza construyendo una curva de calibración con estándares de cuando menos 5 concentraciones diferentes.

Así, se observa la capacidad del sistema para asegurar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del principio activo en la muestra.

La curva de calibración se realiza graficando el cambio de la señal del detector (área, absorbancia, etc.) contra el cambio de concentración de la sustancia analizada. En dicha curva, siguiendo la ecuación de una línea recta $y = Ax + B$, se determina el coeficiente de correlación (r) el cual deberá de aproximarse a la unidad, y la ordenada al origen deberá tender a cero para asegurar que estamos trabajando con un sistema lineal.

La prueba se llevó a cabo usando soluciones estándares de paracetamol (APAP); que se prepararon en un intervalo de concentraciones del 60 al 140% de la concentración teórica de dicho principio activo normalmente utilizada para el análisis, manteniendo constante la concentración del estándar interno, cafeína.

Se determinaron las relaciones de áreas entre el principio activo (APAP) y el estándar interno (C), (ver tabla No. 5). Se graficaron los resultados obtenidos (gráfica No.1); se observa que la respuesta del detector es lineal y sigue la ecuación de una línea recta $y = Ax + B$. Donde el factor de correlación es 0.9998 y la ordenada al origen es de 0.0263, significativamente igual a cero, (ver tabla No. 6) con lo cual se concluye que el sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla No. 5 LINEALIDAD DEL SISTEMA

% DEL NIVEL ENSAYADO	CONCENTRACION DE PARACETAMOL EN MG/ML	RELACION DE AREAS APAP/C
60	0.0491	0.5874
80	0.0654	0.7917
100	0.0818	0.9776
120	0.0982	1.1627
140	0.1145	1.3493

La ecuación de la línea recta es:

$$Y = AX + B$$

Donde "Y" es la relación de áreas y "X" es la concentración de Paracetamol en mg/ml.

Por análisis de mínimos cuadrados:

$$A = 11.5817$$

$$B = 0.0263$$

$$r = 0.9998$$

r = factor de correlación.

Gráfica No. 1:

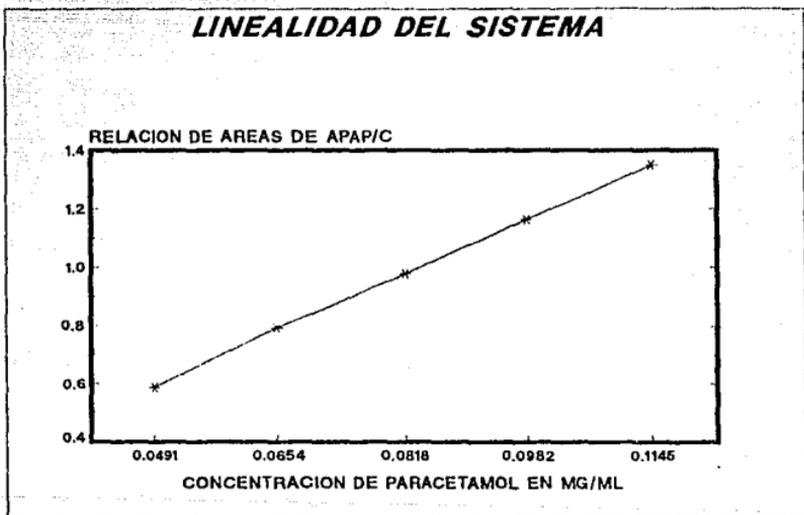


Tabla No. 6

De la tabla No. 5:

X = Conc. de APAP en mg/ml	b = 0.0263
Y = Relación de áreas APAP/C	r = 0.9998
n = 5	\bar{x} = 0.0818
Sxy = 0.42926	Sx ² = 0.0361327
Sx = 0.409	Sy ² = 5.1000
Sy = 4.0687	m = 11.5817

Desviación estándar de la Regresión:

$$S_{x.y} = [S_y^2 - m(S_{xy}) - b(S_y)]^{1/2} = 0.01902$$

Error estándar de la Ordenada al Origen:

$$S_b = S_{x.y} [1/n + \bar{x}^2/n(S_x^2)(S_x)^2]^{1/2} = 0.012866$$

Intervalo de confianza para la Ordenada al origen:

$$IC_b = b \pm t_{(n-2, 0.95)} \times S_b$$

$$IC_b = 0.0263 \pm 3.182 \times 0.012866 = 0.0263 \pm 0.04094$$

$$IC_b = [-0.01464, 0.06724]$$

El intervalo incluye al cero por lo que la ordenada al origen es significativamente igual a cero.

2.1.3. Precisión del sistema:

Con esta prueba se pretende demostrar que el sistema analítico es capaz de detectar siempre la misma cantidad de un principio activo con la mínima variación posible cuando es analizada varias veces.

En la presente validación, esta prueba se realizó preparando una solución estándar de paracetamol en una concentración igual al 100% de la cantidad establecida para realizar el análisis de las muestras. Esta solución se inyectó 6 veces. El experimento se evaluó a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ que equivale a un coeficiente de variación del 2%.

Se determinó la media (\bar{X}) y la desviación estándar relativa (D.E.R.), calculando el factor respuesta de la siguiente manera:

$$K_c = \frac{\text{AREA DE ACETAMINOFEN}}{\text{AREA ESTANDAR INTERNO}} \times \frac{\text{CONC. ESTANDAR INTERNO}}{\text{CONC. ACETAMINOFEN}}$$

De acuerdo con los resultados que se muestran en la tabla No. 7 se concluye que el sistema es preciso bajo estas condiciones ya que la D.E.R. es menor al 2% (0.42%). Donde $D.E.R. = (D.E./\bar{X}) 100$.

2.1.4. Efecto del tamaño de la muestra:

El objetivo de esta prueba es demostrar el efecto del tamaño de la muestra en el análisis, al tomar diferentes alícuotas (equivalentes del 60% al 140% de principio activo) del producto a ensayar; el tamaño intermedio (100%) corresponde al que se toma en el procedimiento normal. Se mantiene constante la concentración del estándar interno.

Se obtienen los porcentajes recuperados de paracetamol a cada una de las muestras ensayadas; se les determina la media (\bar{X}) y la desviación estándar relativa (D.E.R.). (Ver tabla No. 8). La desviación estándar relativa de los recobros (1.73%),

demuestra que el tamaño de la muestra no interfiere con la reproducibilidad del método .

Tabla No. 7 PRECISION DEL SISTEMA

INYECCION NO.	FACTOR RESPUESTA (Kc)
1	2.9694
2	2.9810
3	2.9758
4	2.9962
5	2.9904
6	2.9637

$$\bar{X} = 2.9794$$

$$D.E.R. = 0.42\%$$

Tabla No. 8 EFECTO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

% DEL NIVEL DE PROCEDIMIENTO	CONTENIDO DE PARACETAMOL (MG)	% DE RECUPERACION
60	0.048	100.65
80	0.064	102.96
100	0.080	102.69
120	0.096	99.01
140	0.112	99.80

$$\bar{X} = 101.02\%$$

$$D.E.R. = 1.73\%$$

2.1.5. Precisión del método:

Esta prueba también puede expresarse como reproducibilidad del método; es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por analistas y días diferentes usando el mismo equipo y siguiendo el mismo método analítico. En ella se puede apreciar la variación en los resultados del análisis ocurridos durante la preparación de la muestra.

Esta prueba se realizó analizando 3 muestras del producto terminado, dos días diferentes, realizadas por dos químicos diferentes. Se hicieron 6 análisis cada día para dar un total de 12 análisis cuyos resultados se muestran en la tabla No. 9.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que la técnica es reproducible ya que tiene una desviación estándar relativa menor del 2%, y no existe variación entre los resultados obtenidos interdía ni interanalista. (Ver tabla No. 10).

Tabla No. 9 PRECISION DEL METODO

MUESTRA	QUIMICO	DIA	PARACETAMOL (%)
1	1	1	100.76
2	1	1	100.44
3	1	1	101.67
4	2	1	101.25
5	2	1	100.19
6	2	1	100.67
7	1	2	101.15
8	1	2	101.14
9	1	2	102.07
10	2	2	101.47
11	2	2	101.73
12	2	2	101.89

$$\bar{X} = 101.20\%$$

$$D.E.R. = 0.59\%$$

Tabla No. 10 ANALISIS ESTADISTICO

SUMA PARA CADA ANALISTA

Y_i

$$Y_1 = 607.23$$

$$Y_2 = 607.20$$

$$Y = 1214.43$$

SUMA ANALISTA-DIA

Y_{ij}

$$Y_{11} = 302.87$$

$$Y_{12} = 302.11$$

$$Y_{21} = 304.36$$

$$Y_{22} = 305.09$$

Suma de Cuadrados del Analista (SCa):

$$SCa = \frac{(Y_1)^2 + (Y_2)^2}{d \times r} - \frac{(\sum Y)^2}{d \times r \times a} = 0.0022$$

Suma de Cuadrados del Día por Analista (SCd):

$$SCd = \frac{\sum Y_{ij}^2}{r} - \frac{(Y_1)^2 + (Y_2)^2}{d \times r} = 1.8511$$

Suma de Cuadrados del Error (SCe):

$$SCe = (\sum \sum Y_{ijk}^2) - \frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{r} = 2.0367$$

Donde:

r = número de replicaciones

d = número de días

a = número de analistas

CONTINUACION ANALISIS ESTADISTICO

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD (g)	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS (MC)	F CONCLUSION
Analista	a-1 1	SCa 0.0022	SCa/g1 0.0022	MCa/MCe 0.0086
Día	(d-1) a 2	SCd 1.8511	SCd/g1 0.9256	MCd/MCe 3.6355
Error	(r-1) a d 8	SCe 2.0367	SCe/g1 0.2546	----- -----

Ho : Si F calculada \leq F tablas, se acepta la hipótesis

	Analista	Día
F calculada	0.0086	3.6355
F tablas	5.32	4.46

Por lo tanto el método es reproducible respecto a los analistas y respecto a los días.

2.1.6. Exactitud y linealidad del método:

También conocida como prueba de efecto placebo.

Es la concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia: esta concordancia nos dice qué tanto los resultados promedio de un método se alejan del valor real o verdadero de la muestra.

Esta prueba es importante ya que en muchas ocasiones, por ejemplo, al manufacturar el producto, no se agrega el 100% de la cantidad de principio activo establecida en la formulación, por lo que se hace necesario el poder cuantificar exactamente el principio activo aún cuando varíe la relación principio activo-excipientes.

La prueba de efecto placebo se realizó preparando 5 muestras de placebo a las que se les añadió solución estándar de paracetamol en diferentes proporciones para tener el 60, 80, 100, 120, y 140% de la concentración normal del principio activo (APAP), simulando así las condiciones de falta o exceso del mismo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 11 donde se observa que el porcentaje recuperado de paracetamol en todos los niveles de la prueba es cercano al 100% con una D.E.R. de 1.31% (menor del 2% requerido para aceptar la técnica como exacta).

Con los resultados obtenidos en la prueba de efecto placebo, (tabla No. 12); se realizó un análisis estadístico para determinar la linealidad del método, (tabla No. 13); de acuerdo con los cuales se asume que el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones estudiadas, ya que su coeficiente de correlación lineal es de 0.9994, y sin sesgo ya que se obtiene una pendiente significativamente igual a uno y una ordenada al origen significativamente igual a cero.

Conforme a los resultados anteriores, se puede establecer que el método es capaz de cuantificar la concentración real de paracetamol aún cuando la relación principio activo-excipientes varíe.

Tabla No. 11 EXACTITUD DEL METODO

% DE CONCENTRACION USADA	MG DE PARACETAMOL ADICIONADOS	% RECUPERADO
60	0.04812	99.78
80	0.06416	102.09
100	0.08020	100.98
120	0.09624	99.98
140	0.11228	98.61

$$\bar{X} = 100.29\%$$

$$D.E.R. = 1.31\%$$

Tabla No. 12 EXACTITUD DEL METODO

% DE CONCENTRACION USADA	MG DE PARACETAMOL ADICIONADOS	MG RECUPERADOS
60	0.04812	0.04802
80	0.06416	0.06551
100	0.08020	0.08099
120	0.09624	0.09622
140	0.11228	0.11072

La ecuación de la línea recta es :

$$Y = AX + B$$

Donde "Y" son los mg de paracetamol recuperados y "X" son los mg de paracetamol adicionados al placebo.

Por análisis de mínimos cuadrados:

$$A = 0.9733$$

$$B = 0.002237$$

$$r = 0.9994$$

r = coeficiente de correlación.

Tabla No. 13

De la Tabla No. 11:

$Y = \%$ Recuperado

$n = 5$

$\bar{Y} = 100.288$

$s = 1.3128505$

$t_{(n-1,0.95)} = 2.776$ (Tablas)

Intervalo de Confianza para el $\%$ Recuperado:

$$IC = \bar{Y} \pm [t_{(n-1,0.95)} \times s/n^{1/2}] = 100.288 \pm 1.6298691$$

[98.658131 , 101.92787] Incluye al 100%

Cálculo del valor de t de student:

$$t = \frac{(\bar{Y} - 100) \times n^{1/2}}{s} = 0.4905228 \quad t_{calculada} < t_{tablas}$$

El método es exacto porque: $0.4905228 < 2.776$

De la Tabla No. 12:

$X =$ mg de paracetamol adicionados

$n = 5$

$Y =$ mg de paracetamol recuperados

$S_{xy} = 0.0347011$

$S_x = 0.401$

$S_x^2 = 0.0347330$

$S_y = 0.40146$

$S_y^2 = 0.0346741$

$b = 0.002237$

$r = 0.9994$

$m = 0.9793$

$\bar{X} = 0.0802$

Desviación estándar de la Regresión lineal:

$$S_{y.x} = [(S_y^2) - m(S_{xy}) - b(S_y)/n - 2]^{1/2} = 0.0010012$$

Error estándar de la pendiente:

$$S_m = (S_{y.x}) [1/n(S_x^2) - (S_x)^2]^{1/2} = 0.0088274$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

De tablas: $t_{(n-2,0.95)} = 3.182$ $IC_m = m \pm t_{(n-2,0.95)} \times S_m$

$$IC_m = 0.9732587 \pm 0.0280888$$

[0.9451699 , 1.0013475] Incluye al 1.00

Error estándar para la ordenada al origen:

$$S_b = S_{y.x} [1/n + \bar{X}^2/n(S_x^2) - (S_x)^2]^{1/2} = 0.0008377$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC_b = b \pm t_{(n-2,0.95)} \times S_b = 0.0022367 \pm 0.0026656$$

[-0.0004289 , 0.0049023] Incluye al 0.00

2.1.7. Estabilidad de la muestra:

Esta prueba se realiza para comprobar que la muestra ya lista para ser inyectada es estable a T.A. y/o en refrigeración, ya que éstas son las condiciones en que normalmente se almacena la muestra cuando no es posible realizar su análisis el mismo día en que se preparó.

Esta prueba se efectuó preparando 6 muestras que se analizaron el mismo día de su preparación; estos datos se tomaron como referencia.

Estas muestras se almacenaron (bien tapadas) a T.A. y a 5°C por tres y cinco días para analizarse al término de cada periodo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 14.

Las muestras almacenadas en refrigeración no se analizaron, ya que los resultados obtenidos de las muestras a T.A. indicaron que el principio activo permanecía estable bajo estas condiciones por lo que no se vió la necesidad de emplear refrigeración; en estas muestras sólo se observó su aspecto para ver si no había alguna precipitación, la cual no se presentó.

Basados en estos resultados, es posible fijar la estabilidad de la muestra ya lista para ser inyectada en el cromatógrafo en al menos cinco días si es almacenada a T.A.

Tabla No. 14 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

MUESTRA	A. T. A.	ANALISIS INICIAL (%)	3 DIAS DESPUES (%)	5 DIAS DESPUES (%)
1		100.76	101.49	100.61
2		100.44	100.52	100.96
3		101.67	101.27	100.41
4		101.25	102.12	101.49
5		100.19	100.51	100.41
6		100.67	100.48	100.19
\bar{X}	=	100.83%	101.07%	100.68%
D. E. R.	=	0.54%	0.67%	0.47%

2.2 Validación del Método para Clorhidrato de Fenilpropanolamina (PPA) y Maleato de Clorfeniramina (CTM):

2.2.1. Especificidad:

Los objetivos de este experimento se describieron en la validación del método para paracetamol.

Se obtuvieron cromatogramas de las muestras de producto terminado, placebos y soluciones estándar que a continuación se enlistan, siendo analizadas bajo las condiciones descritas en el desarrollo del método para PPA y CTM.

1. Estándares: (Figura 9)

- a) Fenilpropanolamina
- b) Pirilamina
- c) Clorfeniramina
- d) Factor respuesta

2. Producto terminado, almacenado a: (Figura 10)

- a) Temperatura ambiente, cromatograma con estándar interno
- b) Temperatura ambiente, cromatograma sin estándar interno
- c) 70°C durante 14 días, cromatograma sin estándar interno

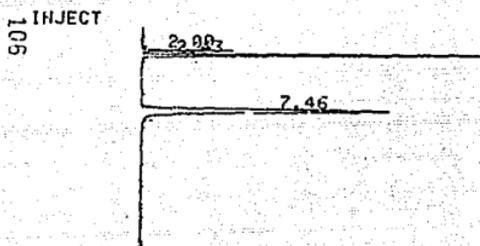
3. Placebos, sin estándar interno:

- a) De PPA a temperatura ambiente
- b) De PPA a 70°C (Figura 11)
- c) De CTM a temperatura ambiente
- d) De CTM a 70°C (Figura 12)
- e) De PPA y CTM a temperatura ambiente
- f) De PPA y CTM a 70°C (Figura 13)

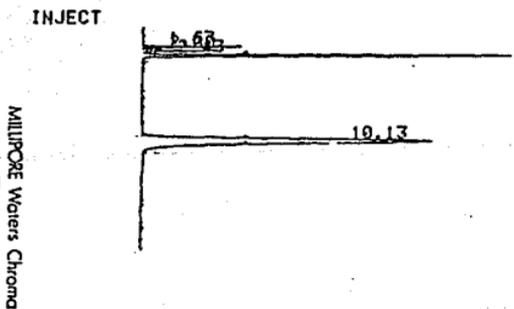
Observando los cromatogramas que se muestran en las figuras No. 9 a 13, se concluye que no hay sustancias que interfieran con los picos de interés, ya que en los cromatogramas correspondientes a los placebos y producto terminado no se observan picos en los mismos tiempos de

retención de fenilpropanolamina, pirilamina y clorfeniramina; por lo tanto el método es específico bajo el sistema cromatográfico establecido.

Figura No. 9



Estándar de Fenilpropanolamina

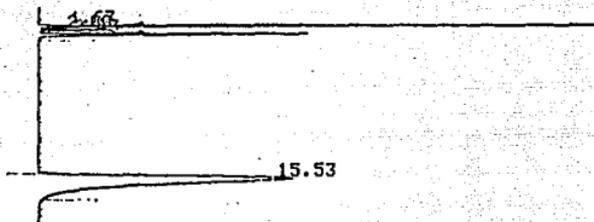


Estándar de Pirilamina

Figura No. 9

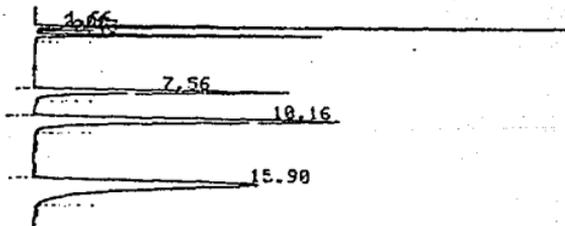
Part No. 74701

INJECT



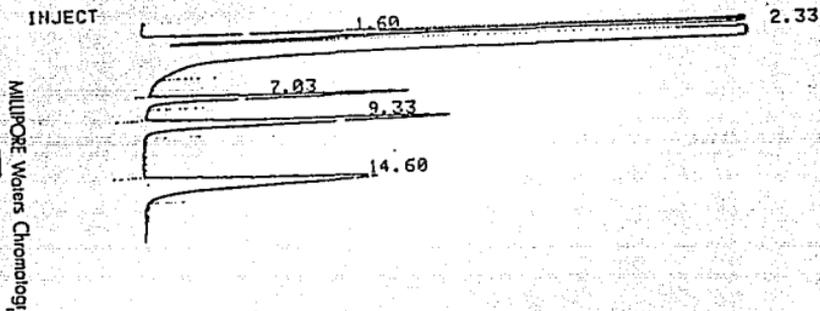
Estándar de Clorfeniramina

INJECT

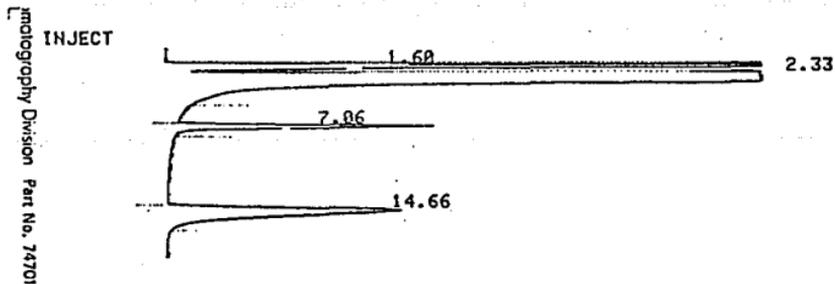


Factor Respuesta

Figura No. 10

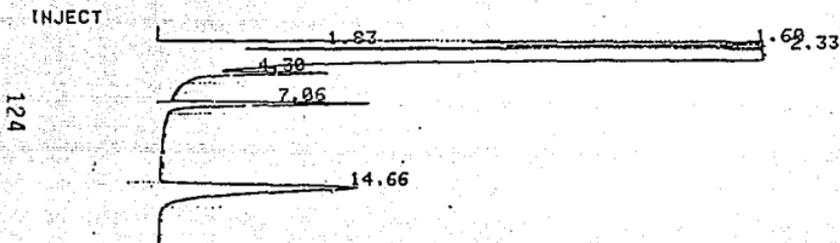


Producto terminado a T.A. con estándar interno



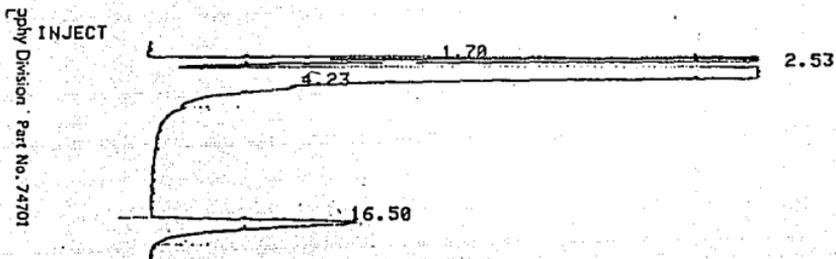
Producto terminado a T.A. sin estándar interno

Figura No. 10

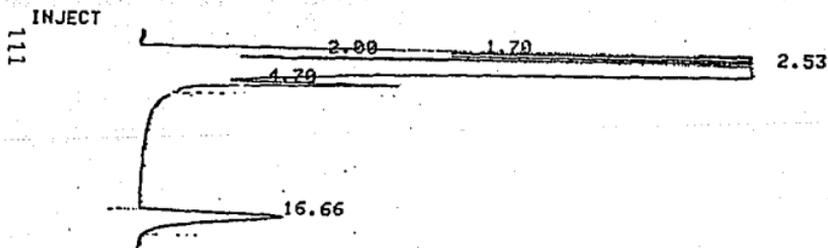


Producto terminado a 70°C sin estándar interno

Figura No. 11

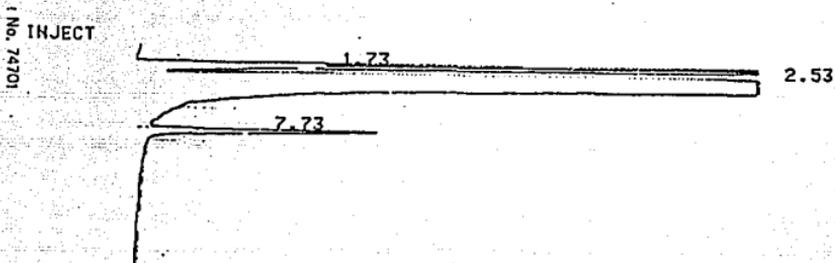


Placebo de PPA a T.A. sin estándar interno

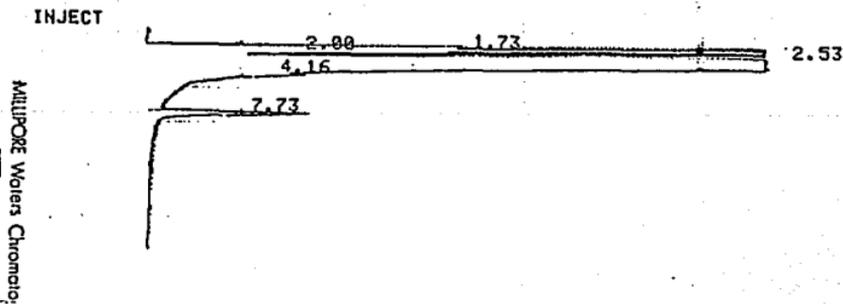


Placebo de PPA a 70°C sin estándar interno

Figura No. 12

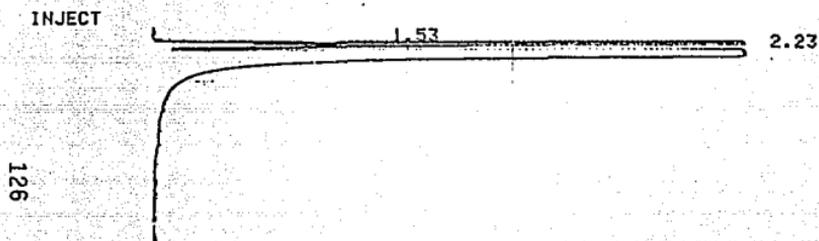


Placebo de CTM a T.A. sin estándar interno

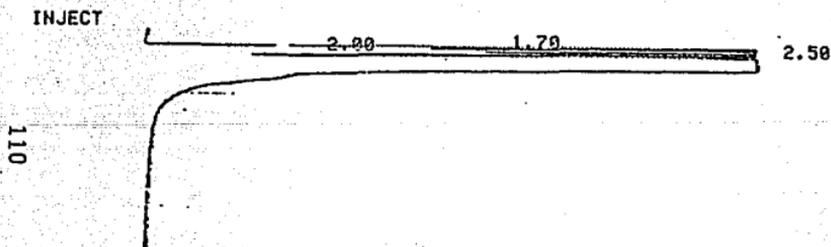


Placebo de CTM a 70°C sin estándar interno

Figura No. 13



Placebo de PPA y CTM a T.A. sin estándar interno



Placebo de PPA y CTM a 70°C sin estándar interno

2.2.2. Linealidad del sistema:

Esta prueba tiene los mismos objetivos que los descritos en la validación del método para paracetamol. También se construye una curva estándar de 5 concentraciones diferentes de los dos estándares; PPA y CTM y se mantuvo constante la cantidad de estándar interno, pirilamina. También se trabajó un intervalo de concentraciones del 60 al 140% de la concentración teórica de los dos principios activos, normalmente usada para el análisis.

Se determinaron las relaciones de áreas entre cada uno de los principios activos (PPA y CTM, respectivamente) y el estándar interno (P). Ver tabla No. 15

Se graficaron los resultados obtenidos (Ver gráficas 2 y 3); se observa que la respuesta del detector es lineal y sigue la ecuación de una línea recta $Y = AX + B$, en ambos casos.

Donde el factor de correlación para PPA es 0.9999 y 0.9999 para CTM; y la ordenada al origen es de 0.0022 para PPA y de -0.0481 para CTM; con lo cual se concluye que el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones estudiado.

Ver tablas 16 y 17.

Tabla No. 15 LINEALIDAD DEL SISTEMA

PPA:

% DEL NIVEL ENSAYADO	CONCENTRACION DE PPA EN MG/ML	RELACION DE AREAS PPA/P
60	0.37704	0.3422
80	0.50272	0.4521
100	0.62840	0.5625
120	0.75408	0.6755
140	0.87976	0.7934

CTM:

% DEL NIVEL ENSAYADO	CONCENTRACION DE CTM EN MG/ML	RELACION DE AREAS CTM/P
60	0.05928	0.7661
80	0.07904	1.0182
100	0.09880	1.2926
120	0.11856	1.5669
140	0.13832	1.8357

La ecuación de la línea recta es :

$$Y = AX + B$$

Donde "Y" es la relación de áreas y "X" es la concentración ya sea de PPA o de CTM en mg/ml.

Por análisis de mínimos cuadrados:

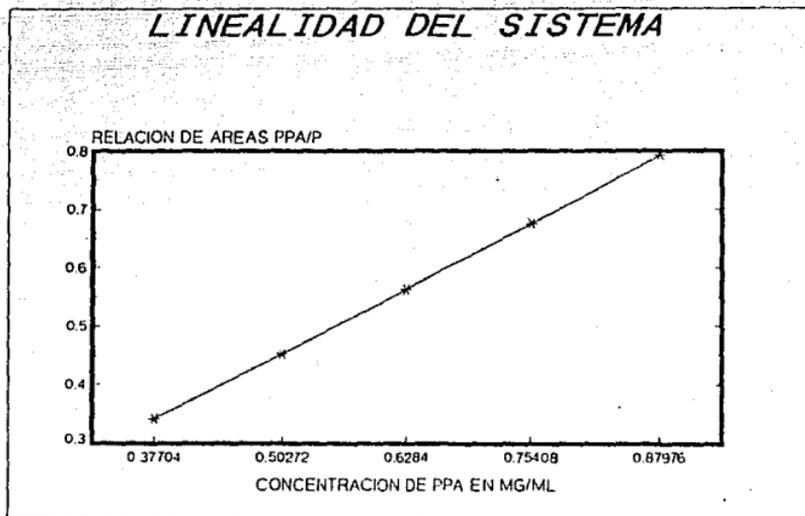
PPA:

A = 0.8958
B = 0.0022
r = 0.9999

CTM:

A = 13.6027
B = -0.0481
r = 0.9999

Gráfica No. 2



Gráfica No. 3

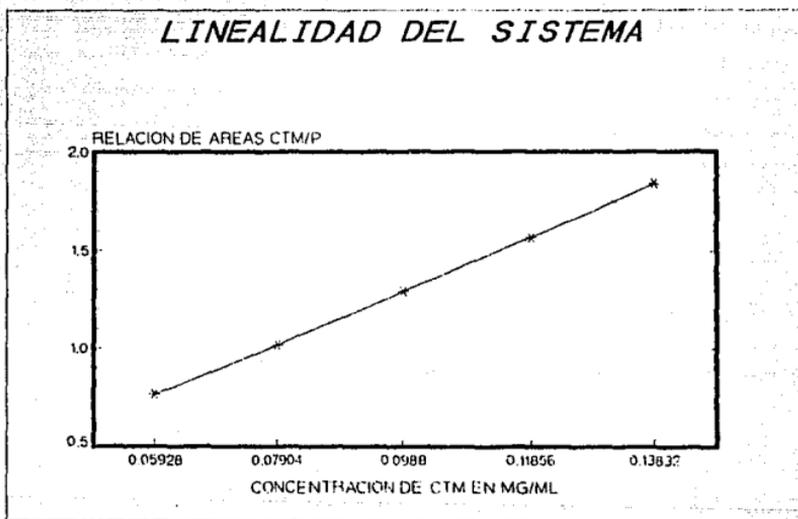


Tabla No. 16 PARA PPA:

De la Tabla No. 15:

X = Conc. de PPA en mg/ml	b = 0.0022
y = Relación de áreas PPA/P	r = 0.9999
n = 5	\bar{X} = 0.6284
Sxy = 1.91716	Sx ² = 2.1324
Sx = 3.142	Sy ² = 1.7237
Sy = 2.8257	m = 0.8958

Desviación estándar de la Regresión:

$$S_{y.x} = [S_y^2 - m(S_{xy}) - b(S_y)]^{1/2} = 0.009567$$

Error estándar de la Ordenada al Origen:

$$S_b = S_{y.x} \cdot [1/n + \bar{X}^2/n(S_x^2)]^{1/2} = 0.0043184$$

Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen:

$$IC_b = b \pm t_{(n-2, 0.95)} \times S_b$$

$$IC_b = 0.0022 \pm 3.102 \times 0.0043184 = 0.0022 \pm 0.013741$$

$$IC_b = [-0.0115411, 0.015941]$$

El intervalo incluye al cero por lo que la ordenada al origen es significativamente igual a cero.

Tabla No. 17 PARA CTM:

De la Tabla No. 15:

X = Conc. de CTM en mg/ml	b = -0.0481
Y = Relación de áreas CTM/P	r = 0.9999
n = 5	\bar{X} = 0.0988
Sxy = 0.69329	Sx^2 = 0.05271
Sx = 0.494	Sy^2 = 9.1194
Sy = 6.4795	m = 13.6027

Desviación estándar de la regresión:

$$S_{y.x} = [Sy^2 - m(Sxy) - b(Sy)]^{1/2} = 2.44225$$

Error estándar de la Ordenada al Origen:

$$S_b = S_{y.x} \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{n(Sx^2)} \right]^{1/2} = 1.448511$$

Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen:

$$IC_b = b \pm t_{(n-2, 0.95)} \times S_b$$

$t_{(n-2, 0.95)} = 3.182$
(De Tablas)

$$IC_b = -0.0481 \pm 3.182 \times 1.448511 = -0.0481 \pm 4.609162$$

$$IC_b = [-4.657262, 4.561062]$$

El intervalo incluye al cero por lo que la ordenada al origen se significativamente igual a cero.

2.2.3. Precisión del sistema:

Se llevó a cabo de igual manera que en la validación del método de paracetamol y cumpliendo con los mismos objetivos.

En la presente validación esta prueba se realizó preparando una solución estándar de PPA y CTM en una concentración igual al 100% de la cantidad establecida para realizar el análisis de las muestras. Esta solución se inyectó 6 veces. El experimento se evaluó a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ que equivale a un coeficiente de variación del 2 %.

Se determinó la media (\bar{X}) y la desviación estándar relativa (D.E.R.) para cada activo, calculando los factores respuesta de la siguiente manera:

$$Kc_{PPA} = \frac{\text{Area}_{PPA}}{\text{Area}_P} \times \frac{\text{Conc.}_P}{\text{Conc.}_{PPA}}$$

$$Kc_{CTM} = \frac{\text{Area}_{CTM}}{\text{Area}_P} \times \frac{\text{Conc.}_P}{\text{Conc.}_{CTM}}$$

De acuerdo con los resultados de la tabla No. 18 se concluye que el sistema es preciso bajo estas condiciones ya que la D.E.R. es menor al 2% en ambos principios activos: 0.70% para PPA y 0.13% para CTM.

$$\text{Donde D.E.R.} = (\text{D.E.}) / \bar{X} \times 100.$$

2.2.4. Efecto del tamaño de la muestra:

Se persiguieron los mismos objetivos descritos en la validación del método de paracetamol y se realizó de la misma manera.

Se obtuvieron los porcentajes de recuperación tanto de PPA como de CTM, en cada nivel de procedimiento ensayado. Se determinó la media y la desviación estándar relativa. Ver tabla No. 19. La desviación estándar relativa de los recobros, (0.49% para PPA y 1.46% para CTM), demuestra que el

Tamaño de la muestra no interfiere con la reproducibilidad del método.

Tabla No. 18 PRECISION DEL SISTEMA

PPA:

INYECCION NO.	FACTOR RESPUESTA (Kc)
1	0.01793
2	0.01814
3	0.01784
4	0.01779
5	0.01792
6	0.01802

$$\bar{x} = 0.01794$$

$$D. E. R. = 0.70\%$$

CTM:

INYECCION NO.	FACTOR RESPUESTA (Kc)
1	0.2621
2	0.2618
3	0.2612
4	0.2614
5	0.2619
6	0.2619

$$\bar{x} = 0.2617$$

$$D. E. R. = 0.13\%$$

Tabla No. 19 EFECTO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

PPA:

% DEL NIVEL DE PROCEDIMIENTO	CONTENIDO TEORICO PPA EN MG	% RECUPERADO
60	0.3756	101.68
80	0.5008	100.98
100	0.6260	100.64
120	0.7512	101.61
140	0.8764	101.78

$$\bar{x} = 101.34\%$$

$$D.E.R. = 0.49\%$$

CTM:

% DEL NIVEL DE PROCEDIMIENTO	CONTENIDO TEORICO CTM EN MG	% RECUPERADO
60	0.0600	99.67
80	0.0800	100.88
100	0.1000	101.00
120	0.1200	103.08
140	0.1400	103.00

$$\bar{x} = 101.53\%$$

$$D.E.R. = 1.46\%$$

2.2.5. Precisión del método:

Este experimento se realizó de la misma manera que se describió en la validación del método para paracetamol.

Los resultados de los 12 análisis se pueden observar en la tabla No. 20. De acuerdo con éstos, se concluye que la técnica es reproducible ya que tiene una desviación estándar relativa menor del 2% para ambos principios activos.

(Ver también tabla No. 21).

Tabla No. 20 PRECISION DEL METODO

PPA:

MUESTRA	QUIMICO	DIA	PPA (%)
1	1	1	101.31
2	1	1	101.79
3	1	1	101.25
4	2	1	99.84
5	2	1	99.59
6	2	1	99.52
7	1	2	101.56
8	1	2	101.75
9	1	2	101.92
10	2	2	101.72
11	2	2	100.96
12	2	2	101.91

$$\bar{x} = 101.09\%$$

$$D.E.R. = 0.91\%$$

Continuación Tabla No. 20

CTH:

MUESTRA	QUIMICO	DIA	CTM (%)
1	1	1	101.08
2	1	1	101.16
3	1	1	100.74
4	2	1	100.16
5	2	1	100.10
6	2	1	100.24
7	1	2	101.94
8	1	2	102.18
9	1	2	102.32
10	2	2	102.16
11	2	2	101.12
12	2	2	102.39

$$\bar{x} = 101.30\%$$

$$D.E.R. = 0.86\%$$

Tabla No 21 ANALISIS ESTADISTICO

PPA:

SUMA PARA CADA ANALISTA

Y₁
Y₁ = 609.58
Y₂ = 603.54
Y = 1213.12

SUMA ANALISTA-DIA

Y_{ij}
Y₁₁ = 304.35
Y₁₂ = 305.23
Y₂₁ = 298.95
Y₂₂ = 304.50

Suma de cuadrados del analista (SCa):

$$SCa = \frac{(\sum Y_1)^2 + (\sum Y_2)^2}{d \times r} - \frac{(\sum Y)^2}{d \times r \times a} = 3.04017$$

Suma de cuadrados del día por analista (SCd):

$$SCd = \frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{r} - \frac{(\sum Y_1)^2 + (\sum Y_2)^2}{r \times d} = 5.43063$$

Suma de cuadrados del error (SCe):

$$SCe = (\sum \sum \sum Y_{ijk}^2) - \frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{r} = 0.8021$$

CTM:

SUMA PARA CADA ANALISTA

Y_i
Y₁ = 609.42
Y₂ = 606.17
Y = 1215.59

SUMA ANALISTA-DIA

Y_{ij}
Y₁₁ = 302.98
Y₁₂ = 306.44
Y₂₁ = 300.50
Y₂₂ = 305.67

Suma de cuadrados del analista (SCa):

$$SCa = \frac{(\sum Y_1)^2 + (\sum Y_2)^2}{d \times r} - \frac{(\sum Y)^2}{d \times r \times a} = 0.88021$$

Suma de cuadrados del día por analista (SCd):

$$SCd = \frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{r} - \frac{(\sum Y_1)^2 + (\sum Y_2)^2}{r \times d} = 6.4501$$

Suma de cuadrados del error (SCe):

$$SCe = \left(\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 \right) - \frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{r} = 1.090$$

Donde :

r = número de replicaciones

d = número de días

a = número de analistas

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
Analista	a-1	SCa	MCa=SCa/g1	MCa/MCe
Día	(d-1)a	SCd	MCd=SCd/g1	MCd/MCe
Error	(r-1)ad	SCe	MCE=SCe/g1	-----

PPA:

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
Analista	1	3.04017	3.04017	30.3221
Día	2	5.43063	2.71532	27.0802
Error	8	0.80210	0.10026	-----

CTH:

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
Analista	1	0.88021	0.88021	6.4074
Día	2	6.4501	3.22505	23.4763
Error	8	1.0990	0.13738	-----

Ho: Si F calculada \leq F tablas, se acepta la hipótesis.

PPA:

CTM:

	Analista	Día	Analista	Día
Fcalc.	30.3221	27.0821	6.4074	23.4763
Ftabl.	5.3200	4.4600	5.3200	4.4600

De acuerdo al análisis de varianza se ve que el error experimental es muy pequeño. Pero dentro de ese pequeño error experimental, las mayores fuentes de variación son el analista y el día, ya que el método es tan sencillo que no se pueden deber a otras fuentes de variación los errores que se presentan; pero el método es reproducible debido a que esta variación (D.E.R.) cae dentro de los límites establecidos (menor al 2%).

2.2.6. Exactitud del método:

Se persiguieron los mismos objetivos descritos en la validación del método para paracetamol y se realizó de igual manera.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 22 donde se puede observar que el porcentaje recuperado tanto de PPA como de CTM, en todos los niveles de la prueba es cercano al 100% con una D.E.R. de 0.56% para PPA y de 0.80% para CTM (menor al 2% requerido para aceptar la técnica como exacta).

Con los resultados obtenidos de esta prueba de efecto placebo, (tabla No. 23); se realizó un análisis estadístico para determinar la linealidad del método, (tabla Nos. 24 y 25); respecto a PPA y a CTM. De acuerdo con los cuales se asume que el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones estudiado, ya que su coeficiente de correlación lineal es de 0.99986 para PPA y de 0.99990 para CTM, y sin sesgo ya que se obtiene una pendiente significativamente igual a uno y una ordenada al origen significativamente igual a cero, en ambos casos. Conforme a los resultados anteriores, se puede establecer que el método es capaz de cuantificar la concentración real de PPA y CTM aún cuando la relación principios activos-excipientes varíe.

Tabla No. 22 EXACTITUD DEL METODO

PPA:

% DE CONCENTRACION USADA	HG DE PPA ADICIONADOS	% DE RECUPERACION
60	0.3751	98.91
80	0.4992	99.42
100	0.6240	99.07
120	0.7502	99.03
140	0.8736	100.18

$$\bar{x} = 99.502\%$$

$$D.E.R. = 0.56\%$$

CTM:

% DE CONCENTRACION USADA	HG DE CTM ADICIONADOS	% DE RECUPERACION
60	0.06000	99.05
80	0.07808	99.87
100	0.09760	99.20
120	0.12000	100.58
140	0.13664	100.36

$$\bar{x} = 99.612\%$$

$$D.E.R. = 0.80\%$$

Tabla No. 23 EXACTITUD DEL METODO

PPA:

% DE CONCENTRACION USADA	MG DE PPA ADICIONADOS	MG DE PPA RECUPERADOS
60	0.3751	0.3710
80	0.4992	0.4963
100	0.6240	0.6238
120	0.7502	0.7429
140	0.8736	0.8752

CTM:

% DE CONCENTRACION USADA	MG DE CTM ADICIONADOS	MG DE CTM RECUPERADOS
60	0.06000	0.05943
80	0.07808	0.07720
100	0.09760	0.09682
120	0.12000	0.12070
140	0.13664	0.13713

La ecuación de la línea recta es:

$$Y = AX + B$$

Donde "Y" son los mg de PPA o de CTM recuperados y "X" son los mg de PPA o de CTM adicionados.

Por análisis de mínimos cuadrados:

PPA:

A = 1.0056
B = -0.0061
r = 0.99986

CTM:

A = 1.0195
B = -0.0022
r = 0.99990

Tabla. No. 24

De la Tabla No. 22: Para PPA:

Y = % Recuperado

n = 5

$\bar{Y} = 99.502\%$

s = 0.7610

$t_{(n-1, 0.95)} = 2.776$ (Tablas)

Intervalo de confianza para el %Recuperado:

$$IC = \bar{Y} \pm [t_{(n-1, 0.95)} \times s/n^{1/2}] = 99.502 \pm 0.696494$$

[98.805506 , 100.19849] Incluye al 100%

Cálculo del valor de t de student:

$$t = \frac{(\bar{Y} - 100) \times n^{1/2}}{s} = 1.9848671 \quad t_{\text{calculada}} < t_{\text{tablas}}$$

El método es exacto porque: $1.9848671 < 2.776$

De la Tabla No. 23: Para PPA:

X = mg de PPA adicionados

n = 5

Y = mg de PPA recuperados

$S_{xy} = 2.0980646$

$S_x = 3.1221$

$S_x^2 = 2.1052537$

$S_y = 3.1092$

$S_y^2 = 2.0909566$

b = -0.00661

r = 0.99986

m = 1.0056

$\bar{X} = 0.62442$

Desviación estándar de la regresión lineal:

$$S_{y.x} = [(S_y^2) - m(S_{xy}) - b(S_y)/n - 2]^{1/2} = 0.003793$$

Error estándar de la pendiente:

$$S_m = (S_{y.x}) [1/n(S_x^2) - (S_x)^2]^{1/2} = 0.0042868$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$\text{De tablas: } t_{(n-2, 0.95)} = 3.182 \quad I_{Cm} = m \pm t_{(n-2, 0.95)} \times S_m$$
$$I_{Cm} = 1.0055596 \pm 0.0136406$$

[0.991919 , 1.0192002] Incluye al 1.00

Error estándar para la ordenada al origen:

$$S_b = S_{y.x} [1/n + \bar{X}/n(S_x^2) - (S_x)^2]^{1/2} = 0.031666$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$I_{Cb} = b \pm t_{(n-2, 0.95)} \times S_b = -0.0060515 \pm 0.0100761$$

[-0.0161276 , 0.0040246] Incluye al 0.00

Tabla No. 25

De la Tabla No. 22: Para CTM:

$$\begin{aligned} Y &= \% \text{ Recuperado} & n &= 5 \\ \bar{Y} &= 99.612 & s &= 0.7956758 \\ t_{(n-1, 0.95)} &= 2.776 \text{ (Tablas)} \end{aligned}$$

Intervalo de confianza para el % Recuperado:

$$IC = 99.612 \pm 0.9878036 \quad [98.624196, 100.59981]$$

Incluye al 100%

Cálculo del valor de t de student

$$t = 1.0903868 \quad t_{\text{calculada}} < t_{\text{Tablas}}$$

El método es exacto porque: $1.0903868 < 2.776$

De la Tabla No. 23: Para CTM:

$$\begin{aligned} X &= \text{mg de CTM adicionados} & n &= 5 \\ Y &= \text{mg de CTM recuperados} & S_{xy} &= 0.0522647 \\ S_x &= 0.49232 & S_x^2 &= 0.0522927 \\ S_y &= 0.49128 & S_y^2 &= 0.0522390 \\ b &= -0.0022 & r &= 0.99990 \\ m &= 1.0193 & \bar{X} &= 0.098464 \end{aligned}$$

Desviación estándar de la regresión lineal:

$$S_{y.x} = 0.0010954$$

Error estándar de la pendiente:

$$S_m = 0.0079293$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC_m = 1.0194913 \pm 0.0252309 \quad [0.9943, 1.0447]$$

Incluye al 1.00

Error estándar para la ordenada al origen:

$$S_b = 0.0009217$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC_b = -0.00213 \pm 0.0029329 \quad [-0.0050629, 0.0008029]$$

Incluye al 0.00

2.2.7. Estabilidad de la muestra:

Esta prueba se realiza para comprobar que la muestra va lista para ser inyectada es estable a T.A. y/o en refrigeración ya que éstas son las condiciones en que normalmente se almacena la muestra cuando no es posible realizar su análisis el mismo día en que se preparó.

Esta prueba se efectuó preparando seis muestras que se analizaron el mismo día de su preparación; estos datos se tomaron como referencia.

Estas muestras se almacenaron (bien tapadas) a T.A. y a 5°C por tres y cinco días para analizarse al término de cada periodo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 26.

Las muestras almacenadas en refrigeración no se analizaron, ya que los resultados obtenidos de las muestras a T.A. indicaron que los principios activos permanecían estables bajo estas condiciones por lo que no se vió la necesidad de emplear refrigeración.

Basados en estos resultados, es posible fijar la estabilidad de la muestra va lista para ser inyectada en el cromatógrafo, en al menos 5 días si es almacenada a T.A.

Tabla No. 26 ESTABILIDAD DE LA HUESTRA

PPA:

MUESTRA A T.A.	ANALISIS INICIAL (%)	5 DIAS DESPUES (%)
1	101.56	101.79
2	101.75	101.98
3	101.92	101.41
4	101.72	101.57
5	100.96	100.54
6	101.91	100.77
\bar{x}	= 101.64	101.34
D. E. R.	= 0.35%	0.56%

CTM:

MUESTRA A T.A.	ANALISIS INICIAL (%)	5 DIAS DESPUES (%)
1	101.94	101.62
2	102.18	102.00
3	102.32	101.42
4	102.16	101.94
5	101.12	101.78
6	102.39	102.06
\bar{x}	= 102.02	101.80
D. E. R.	= 0.46%	0.24%

TERCERA PARTE

CONCLUSIONES

CAPITULO VI: CONCLUSIONES DEL DESARROLLO DE LA FORMULACION:

A partir de los resultados obtenidos del estudio de formulación, se llega a las siguientes conclusiones, que cubren todos los objetivos planteados:

1. La solución oral pediátrica se logró formular sin alcohol y sin azúcar.

2. Se logró desarrollar un procedimiento de manufactura bastante sencillo para la solución oral pediátrica.

3. Se obtuvo una formulación con una solubilidad total de los tres principios activos: Clorhidrato de Fenilpropanolamina, Maleato de Clorfeniramina y Paracetamol. Este último logró solubilizarse completamente en la formulación por la intervención de un cosolvente; el propilenglicol.

4. La formulación de la solución oral pediátrica tiene un sabor aceptable. Tiene un gusto que se encuentra a la altura de otros productos similares.

5. Se logró que la formulación sea estable en frasco de polietileno de alta densidad, el cual es más económico que el frasco de vidrio.

6. La solución oral pediátrica obtenida es estable física, química y microbiológicamente durante un periodo de tres años, al menos.

7. Con este trabajo se puede ofrecer a la población infantil menor de 2 años un producto analgésico, antipirético y descongestionante nasal, que ayude a aliviar las molestias de la gripe.

CAPITULO VII: CONCLUSIONES DEL DESARROLLO Y VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS:

De los resultados obtenidos en la parte experimental, se concluye acerca de los dos sistemas cromatográficos:

1. Son tolerantes, ya que proporcionan una buena resolución, aún cuando se varíen las condiciones de flujo, pH, ó composición de la fase móvil, dentro de ciertos límites.

2. La respuesta del detector, en ambos casos, es lineal para un intervalo de concentraciones comprendido entre el 60% y el 140% de la concentración de los estándares.

3. Los sistemas desarrollados son precisos, teniendo una desviación estándar relativa menor al 1% en la respuesta del detector, en ambos casos.

De los métodos analíticos para la determinación cuantitativa del paracetamol y de la fenilpropanolamina simultáneamente con clorfeniramina, en la solución oral pediátrica; se concluye que:

4. Son específicos en cada caso, para los principios activos.

5. Son exactos y lineales porque recuperan cerca del 100% de los activos, cuando se analizan muestras conteniendo del 60 al 140% de concentración de éstos.

6. Son reproducibles, de químico a químico y de un día a otro.

7. Las muestras, listas para ser inyectadas a cualquiera de los dos sistemas cromatográficos, son estables al menos durante 5 días almacenadas a temperatura ambiente y por lo tanto pueden ser usadas con seguridad.

En resumen: los dos métodos desarrollados son confiables para cuantificar al paracetamol, al clorhidrato de fenilpropanolamina y al maleato de clorfeniramina, en la solución oral pediátrica y válidos para las condiciones en las que fueron establecidos. Y se pueden aplicar tanto para el control de calidad del producto terminado, como para estudiar la estabilidad del mismo.

CUARTA PARTE

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Windholz, M. Editor. "The Merck Index". Ninth edition. Merck & Co., Inc. U.S.A. 1976. pp 36,954.
2. Clarke, E.G.C. "Isolation and Identification of Drugs" The pharmaceutical Press. London 1969. pp 445, 254-255.
3. Blacow, N.W. Editor. "Martindale:Extra Pharmacopoeia 27th ed." The pharmaceutical Press. London 1967. pp 201-202, 1294, 29.
4. Hoover, John E. Editor. "Remington's Pharmaceutical Science". 15th edition. U.S.A. 1975. pp 820, 1437.
5. AMA "Drugs Evaluations. 1st edition.1971.
6. Ansel, H.C. "Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms". Lea & Febiger. U.S.A. 1969. pp 78-138.
7. Lachman L., Lieberman H.A., "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy" 2nd. edition, Lea & Febiger, U.S.A. (1976) Capítulos 1 y 19.
8. Banker, G.S., Rhodes C.I. . "Modern Pharmaceutics" Marcel Dekker Inc., U.S.A. (1979), Capítulos 6 y 9.
9. Helman J., "Farmacotecnia Teórica y Práctica", Cía. Editorial Continental. México, (1982), pp 1808-1827, 1468-1484, Capítulo 66.
10. Florey K. Editor. "Analytical Profiles of Drug Substances". Vol.3. Academic Press. U.S.A. 1974. pp 5-88, 552-589, 43-75, 357-379.

11. Goodman L.S., Gilman A., "Bases Farmacológicas de la Terapéutica" 5a. ed., Nueva editorial Interamericana, México (1980). pp 289-292; 509-512; 404-423.
12. Koshy K.T. et al.; J. Pharm. Sci. 56, (1967) pp 1117.
13. Kalatzis E; J. Pharm. Sci. 59, (1970) pp 193.
14. Lipman E.C., Summers M. P. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 32, (1980) pp 21.
15. Barry R.H. et al. J. Pharm. Sci., 71, (1982) pp116-118.
16. Gupta V.D., Jacob J.T. Drug Development and Industrial Pharmacy, 13, (1987) pp 113.
17. Madsen R.E., Magin D.F. J. Pharm. Sci., (1976) pp 924.
18. Gupta V.D., Heble A.R., J. Pharm. Sci. (1984) pp 1553.
19. Richardson H., Bidlingmeyer B.A., J. Pharm. Sci. 73, (1984) pp 1480-1481.
20. Bidlingmeyer B.A., et al. Anal Chem., 54, (1982) 442-447.
21. Waters, Technical Bulletin. "The Separation of Amines using the Radial Compression Separation System"
22. Millipore Waters Chromatography Division, "Waters Sourcebook for Chromatography Columns and Supplies", pp 18.
23. Johnson E.L., Stevenson R., "Basic Liquid Chromatography", Varian, U.S.A., 1978.
24. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd. edition, John Wiley and

sons, Inc., U.S.A. (1979).

25. Yost, R.W. Eltre L.S., Conlon R.D., "Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica", The Perkin - Elmer Corp., Chromatography Division, U.S.A. (1981).
26. Couriel B.D. Editor, "Validación de Procesos Farmacéuticos", Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C., México (1982), pp 13-15.
27. De Voe, J. Editor, "Validation of the Measurement Presess", ACS Symposium Series 63, American Chemical Society, pp 23-24, 176-177.
28. Colegio Nacional de QFB's, "Anteproyecto de Norma Técnica para la realización de Pruebas de Estabilidad", México, 1991.

sons, Inc., U.S.A. (1979).

25. Yost, R.W. Ettore L.S., Conlon R.D., "Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica", The Perkin - Elmer Corp., Chromatography Division, U.S.A. (1981).
26. Couriel B.D. Editor, "Validación de Procesos Farmacéuticos", Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C., México (1982), pp 13-15.
27. De Voe, J. Editor, "Validation of the Measurement Presess", ACS Symposium Series 63, American Chemical Society, pp 23-24, 176-177.
28. Colegio Nacional de QFB's, "Anteproyecto de Norma Técnica para la realización de Pruebas de Estabilidad". México, 1991.