

Nº 150  
2EJ.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**Desarrollo y Validación de la Metodología Analítica  
por Clar para la Cuantificación de Benzocaina,  
Cafeína Feniramina y Piridoxina, en Microesferas  
de Liberación Controlada.**

**T E S I S    P R O F E S I O N A L**

QUE    PARA    OBTENER    EL    TITULO    DE :

**QUIMICO    FARMACEUTICO    BILOGO**

P   R   E   S   E   N   T   A   :

Miguel Guadalupe Sánchez Hernández

MEXICO, D. F.

1992

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

CAPITULOS	PAGINAS
1. INTRODUCCION.....	1
2. GENERALIDADES.....	3
2.1 Monografías.....	3
2.1.1 Benzocaína.....	3
2.1.2 Cafena.....	9
2.1.3 Maleato de Feniramina.....	15
2.1.4 Clorhidrato de Piridoxina.....	19
2.2 Formas farmacéuticas de uso oral de liberación controlada.....	25
2.2.1 Clasificación.....	28
2.2.2 Consideraciones.....	31
2.2.3 Tecnología.....	38
2.2.4 Evaluación.....	48
2.3 Cromatografía.....	51
2.3.1 Clasificación.....	51
2.3.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	56
2.3.2.1 Cromatografía de Pares Iónicos.....	57
2.3.3 Parámetros Cromatográficos.....	60

CAPITULOS	PAGINAS
2.3.4 Equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	64
2.3.4.1 Reservorios.....	64
2.3.4.2 Bomba Cromatográfica.....	65
2.3.4.3 Sistemas de Inyección de Muestras.....	68
2.3.4.4 Columna Cromatográfica.....	68
2.3.4.5 Temperatura de la Columna Cromatográfica.....	70
2.3.4.6 Detectores.....	71
2.3.5 Análisis Cualitativo.....	74
2.3.6 Análisis Cuantitativo.....	75
3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	77
3.1 Definiciones.....	77
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	81
4.1 Desarrollo del Método.....	81
4.1.1 Equipo y Material.....	81
4.1.2 Reactivos.....	82
4.1.3 Determinación de Cafeína, Maleato de Feniramina y Benzocaina.....	83
4.1.3.1 Parámetros Instrumentales.....	83
4.1.3.2 Preparación de Soluciones.....	84
4.1.3.3 Análisis.....	86
4.1.3.4 Cálculos.....	87

CAPITULOS	PAGINAS
4.1.3.5 Validación del Método Cromatográfico.....	89
4.1.3.6 Resultados.....	92
4.1.4 Determinación de Clorhidrato de Piridoxina, Cafeína y Benzocaína.....	110
4.1.4.1 Parámetros Instrumentales.....	110
4.1.4.2 Preparación de Soluciones.....	111
4.1.4.3 Análisis.....	113
4.1.4.4 Cálculos.....	113
4.1.4.5 Validación del Método.....	114
4.1.4.6 Resultados.....	116
5. DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	134
6. BIBLIOGRAFIA.....	137

# CAPITULO 1

## INTRODUCCION

Las formas farmacéuticas de uso oral de liberación controlada, aparecen como una nueva forma de dosificación a principios de los años 50's. Los productos así designados, tienen la intención de modificar y mejorar la acción del principio activo, mediante el incremento de la duración de la acción, así como de la disminución de la frecuencia de administración.

Dentro de la investigación de nuevas formulaciones, el desarrollo analítico tiene un papel importante, para que conociendo las propiedades fisicoquímicas de los principios activos que forman parte del producto y mediante la aplicación de técnicas de separación, detección y cuantificación, se obtenga toda la información acerca del comportamiento del producto durante todas las fases de su desarrollo, con el fin de obtener la mas alta calidad de diseño.

En el análisis de una forma farmacéutica que contenga dos o más principios activos, uno de los mayores problemas en el desarrollo de la metodología analítica, es lograr la separación de la sustancia de interés del resto de los componentes de la muestra; la cromatografía es la técnica que permite llevar a cabo este proceso, aún en mezclas muy complejas. Actualmente presenta mayor aceptación y aplicación, debido a que se cuenta con equipos automatizados que permiten realizarla de una manera rápida y eficiente.

Para considerar que se ha desarrollado una metodología analítica, es necesario comprobar que dicha metodología cumple con los propósitos para los cuales fue diseñada, esto se logra mediante la calificación de cada uno de los elementos que. A consideración del analista, deban efectuarse al llevar a cabo la validación de la metodología analítica.

El presente trabajo tuvo por objeto, el desarrollo y la validación de la metodología analítica por cromatografía de líquidos de alta resolución, que permitió separar y cuantificar a la Benzocaína, Cafeína, Maleato de Feniramina y Clorhidrato de Piridoxina en una forma farmacéutica de liberación controlada.



## CAPITULO 2

# GENERALIDADES

## 2.1 MONOGRAFÍAS.

### 2.1.1 BENZOCAINA

- Nombres químicos y sinónimos: ( 1, 2, 3 )

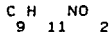
Étil p-aminobenzoato, etil 4-aminobenzoato.

Anestamina, Anestésina.

- Fórmula desarrollada: ( 1 )



- Fórmula molecular: ( 1 )



- Peso molecular: ( 1 )

165.19

- Descripción: ( 2 )

Cristales incoloros o polvo cristalino blanco.

- pKa: ( 4 )

2.49

- Solubilidad: ( 2 )

Muy ligeramente soluble en agua, soluble en 8 partes de etanol al 96 por ciento, en 2 partes de cloroformo, en 4 partes de éter.

- Temperatura de Fusión: ( 1 )

Entre 88° y 92 °C.

- Ensayos de identidad:

a) Disolver 1.0 g en 100 ml de alcohol neutro, se produce una solución clara; diluir esta solución con 10 ml de agua y añadir 2 gotas de solución indicadora de fenolftaleína y una gota de solución 0.1 N de hidróxido de sodio; se produce una coloración roja. ( 1 )

b) Espectro en el ultravioleta. Una solución 1 : 200,000 en cloroformo, exhibe máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de USP benzocaína TS, y las respectivas absorptividades, calculadas en base seca, a la máxima longitud de onda aproximadamente 278 nm no difieren por más de 3.0 por ciento. ( 1 )

c) Espectro en el infrarrojo. Una dispersión en bromuro de potasio, previamente secada sobre pentóxido de fósforo durante 3 horas, exhibe máximos solamente a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de USP benzocaína TS. ( 1 )

- Ensayos de pureza. Secado sobre pentóxido de fósforo, durante 3 horas: contiene no menos del 98.0 por ciento y no más del 101.0 por ciento de  $C H N O$ . ( 1 )

9 11 2

a) Acidez o alcalinidad. Diluir 5 ml de una solución al 10 por ciento ( m/v ) en etanol al 96 por ciento con 10 ml de agua y añadir 0.05 ml de solución indicadora de fenolftaleína; no se produce coloración rosa. Añadir 0.5 ml de una solución 0.01 M de hidróxido de sodio: la solución desarrollará una coloración rosa. ( 2 )

b) Claridad de la solución: 10 ml de una solución al 10 por ciento ( m/v ) en alcohol al 96 por ciento es clara. ( 2 )

c) Sulfatos: No más del 0.1 por ciento. ( 2 )

d) Residuo de la ignición: No más del 0.1 por ciento. ( 1 )

e) Pérdida por secado. Sobre pentóxido de fósforo, durante 3 horas, pierde no más del 1.0 por ciento de su peso. ( 1 )

f) Metales pesados: No más de 0.001 por ciento ( 1 )

g) Cloruros. A una solución de 200 mg en 5 ml de alcohol, previamente acidulado con solución de ácido nítrico concentrado, añadirle unas gotas de nitrato de plata: no debe producirse turbidez inmediata. ( 1 )

- Valoración. ( 2 )

Disolver 400 mg de benzocaína en una mezcla de 25 ml de solución 1 N de ácido clorhídrico y 50 ml de agua, añadir 3 g de bromuro de potasio, enfriar con hielo si es necesario, y titular amperométricamente con solución 0.1 M de nitrato de sodio.

Cada ml de la solución 0.1 M de nitrato de sodio equivale a 0.01652 g de  $C_9H_{11}NO_2$ .

- farmacodinamia. ( 5, 6 )

Actúa sobre la transmisión de todas las fibras nerviosas, ya sean sensitivas, motoras o autónomas, bloqueando la conducción de impulsos nerviosos, interfiriendo con el movimiento de los iones de sodio a través de la membrana y en menor proporción, con la de los iones de potasio, estos movimientos son esenciales en la transmisión del impulso nervioso.

- Farmacocinética. ( 7 )

La absorción es rápida en las mucosas y membranas de la tráquea, laringe, pulmones, conjuntiva y uretra. Se excreta rápida y completamente por la orina, no se acumula y sus dos probables metabolitos urinarios son el ácido hipúrico y el ácido para-aminobenzoilglucorónico. La excreción urinaria normal para el ácido hipúrico, en el hombre, es de 1.0 a 2.5 gramos diarios, equivalentes a 0.7 a 1.7 gramos de ácido benzoico ( 17 mg/min ).

- Usos. ( 3 )

La benzocaína es un anestésico local de tipo éster, no es irritante y tiene una baja toxicidad sistémica, por vía oral se usa para aliviar el dolor en la úlcera y el carcinoma de estómago. Pastillas compuestas de benzocaína disueltas en la boca, sirven para prevenir la náusea y el vómito en la toma de impresiones dentales y en la introducción de aparatos de endoscopia oral. En soluciones al 2 por ciento se emplea para aliviar el dolor causado por laceraciones en la lengua o mejilla, la faringitis aguda, la tonsilectomía y el carcinoma de lengua.

- Toxicidad. ( 7, 8 )

A las concentraciones de las soluciones que normalmente se emplean ( de 2 a 10 por ciento ) la benzocaína no es irritante ni tóxica. Se han reportado algunos casos de metahemoglobinemia en niños, subsecuente a la absorción de benzocaína. No se recomienda su uso en pacientes que estén siendo tratados con sulfonamidas.

- Dosis. ( 3, 7 )

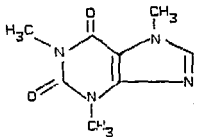
Se han administrado hasta 4 gramos diarios; pero la dosis diaria aceptable, estimada para el hombre por cualquier vía es de 5 mg/Kg de peso.

## 2.1.2 CAFEINA

- Nombres químicos y sinónimos: ( 9, 10 )

1,3,7- trimetilxantina, 7- metilteofilina.

- Fórmula desarrollada: ( 9 )



- Fórmula molecular: ( 9 )

C H N O  
8 10 4 2

- Peso molecular: ( 9 )

194,2

- Descripción: ( 9 )

Polvo blanco cristalino o agujas brillantes, generalmente aglomeradas, inodoro, la forma hidratada es eflorescente al aire.

- Solubilidad: ( 9 )

Fácilmente soluble en cloroformo, poco soluble en agua y en alcohol, ligeramente soluble en éter.



- Temperatura de fusión: ( 11 )

Entre 235° y 238 °C.

- Ensayos de identidad:

a) En una cápsula de porcelana, disolver aproximadamente 5 mg de la muestra en 1 ml de ácido clorhídrico, agregar 50 mg de clorato de potasio y evaporar en baño de vapor hasta sequedad, invertir la cápsula sobre un recipiente que contenga algunas gotas de solución de reactivo de amoníaco, el residuo toma coloración púrpura que desaparece al agregar álcalis fijos. ( 9 )

b) Espectro en el infrarrojo ( de una dispersión de bromuro de potasio ):

Presenta los siguientes máximos: 747, 1454, 1548, 1658 y 1698  $\text{cm}^{-1}$ . ( 10 )

c) A 0.25 ml de una solución saturada adicionar 1 ml de una solución al 5 por ciento de ácido tánico: se produce un precipitado blanco, el cual desaparece por la adición de un exceso de la solución de ácido tánico. ( 2 )

- Ensayos de pureza.

La cafeína es anhidra o puede contener una molécula de agua de hidratación. Contiene no menos de 98.5 por ciento y no más de 101.0 por ciento de  $C_8H_{10}N_4O_2$  calculada en la sustancia seca. ( 9 )

- a) Acidez o alcalinidad. Calentar a ebullición 0.5 g en 50 ml de agua y enfriar ( sol. A ). A 10 ml de ésta solución adicionar 0.05 ml de solución de azul de bromotimol; la solución se torna amarilla verdosa y se requiere no más de 0.2 ml de una solución 0.1 M de hidróxido de sodio para cambiar la coloración a azul. ( 2 )
- b) Claridad de la solución. La solución A es clara. ( 2 )
- c) Sulfatos. La solución A, no debe dar más de 500 ppm. ( 2 )
- d) Cloruros. La solución A, no debe dar más de 150 ppm. ( 2 )
- e) Residuo de la ignición. No más de 0.1 por ciento. ( 11 )
- f) Metales pesados. No más de 0.002 por ciento. ( 1 )

g) Otros alcaloides. A 5 ml de una solución ( 1 en 50 ) adicionar unas gotas de solución de prueba de yoduro de potasio mercúrico: no debe formarse precipitado. ( 2 )

h) Pérdida al secado. Secado a 80°C durante cuatro horas con vacío: la forma anhidra pierde no más de 0.5 por ciento, la forma hidratada pierde no más de 8.5 por ciento. ( 9 )

- Valoración. ( 11 )

Pesar aproximadamente 0.4 g de cafeína previamente secada, disolver en 40 ml de anhídrido acético con calentamiento, enfriar, adicionar 80 ml de benceno y titular con solución 0.1 N de ácido perclórico hasta que el color de la solución cambie de púrpura a amarillo, emplear 3 gotas de cloruro de metilanilina como indicador.

Desarrollar un blanco de determinación en la misma forma y hacer la corrección correspondiente.

Cada ml de solución valorada 0.1 N de ácido perclórico equivale a 0.01942 g de C H N O .

8 10 4 2

- Farmacodinamia. ( 12, 13 )

La cafeína tiene una acción de traslocación del Ca<sup>2+</sup> intracelular: puede inhibir a la fosfodiesterasa del nucleótido cíclico ( la enzima que cataliza la hidrólisis del AMP cíclico ); bloquea a los receptores para la adenosina.

- Farmacocinética. ( 12, 13 )

Se absorbe rápidamente después de su administración oral, rectal o parenteral, se distribuye en todo el organismo, sin embargo, no se acumula, aproximadamente el 1 por ciento de la cafeína administrada se recupera en la orina sin modificación. En 48 horas el 45 por ciento de una dosis es excretada en la orina como 1-metilxantina y ácido 1-metilúrico.

- Usos. ( 12, 13 )

Con frecuencia se asocia la cafeína, con analgésicos contra la cefalgia pues, aunque por sí sola no es analgésica, parece reforzar el efecto de estos probablemente por mejorar la circulación del cerebro, y por su efecto sobre el estado de ánimo, también es empleado para contrarrestar la sedación ocasionada por el empleo de antihistamínicos. Se emplea para relajar el músculo liso bronquial en el tratamiento del asma y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Su uso como estimulante del sistema nervioso central en el tratamiento de la sobredosis de barbitúricos u opiáceos ha disminuido marcadamente, el uso de la acción diurética de la cafeína, se limita a la inclusión de la cafeína en cantidades subterapéuticas en las preparaciones de venta libre.

- Toxicidad. ( 12 )

El envenenamiento mortal humano por ingestión de cafeína, es extremadamente raro. No obstante, pueden observarse reacciones indeseables después de la ingestión de 1 g ( 15 mg/Kg ) o más de cafeína, las cuales se relacionan principalmente con el sistema nervioso central y circulatorio: insomnio, inquietud y excitación son los primeros síntomas, que puede avanzar hasta un ligero delirio.

- Dosis. ( 14 )

La dosis usual en adulto es de 200 mg diarios, con un rango de 100 a 500 mg.

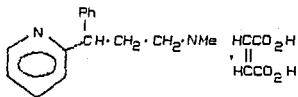
### 2.1.3 MALEATO DE FENIRAMINA.

- Nombres químicos y sinónimos. ( 2, 8 )

NN-dimetil-3-fenil-3-(2-piridil) propilamina hidrogeno maleato.

Metron, Hinhistron, Trimeton.

- Fórmula desarrollada. ( 2 )



- Fórmula molecular. ( 2 )

C H N , C H O  
16 20 2 4 4 4

- Peso molecular. ( 2 )

356.4

- Descripción. ( 2, 3 )

Polvo cristalino blanco o casi blanco, ligeramente oloroso.

- Solubilidad. ( 2 )

Soluble en 0.3 partes de agua, en 2.5 partes de etanol al 96 por ciento, en 1.5 partes de cloroformo y en 6000 partes de éter.

- Temperatura de fusión. ( 2 )

Entre 104° y 108 °C.

- Ensayos de identidad.

a) Disolver 0.5 g en 5 ml de agua, adicionar 2 ml de solución 13.5 M de hidróxido de amonio y extraer tres veces, cada una con 5 ml de cloroformo. Evaporar la fase acuosa a sequedad, adicionar 0.2 ml de ácido sulfúrico R. A. y 5 ml de agua, y extraer cuatro veces con 25 ml de éter. Combinar los extractos etéreos y evaporar con precaución. El punto de fusión del residuo es de 137 °C. ( 2 )

b) El espectro de absorción, en el rango de 230 a 350 nm de una solución al 0.002 por ciento en solución 0.1 M de ácido clorhídrico presenta un máximo a 265 nm y una inflexión a 262 nm, la absorbancia a 265 nm es aproximadamente 0.83 ( 2 )

c) Espectro en el infrarrojo ( de una dispersión de bromuro de potasio ):

Exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de Maleato de Feniramina ( sustancia de referencia ). ( 2 )

- Valoración. ( 2 )

Disolver aproximadamente 500 mg de Maleato de Feniramina exactamente pesados, en 100 ml de ácido acético glacial, calentar ligeramente hasta completa disolución de la muestra, enfriar a temperatura ambiente y titular con solución valorada 0.1 N de ácido perclórico, utilizando 1-naftolbenceno como indicador.

Desarrollar un blanco de determinación en la misma forma y hacer la corrección correspondiente.

Cada ml de solución valorada 0.1 M de ácido perclórico equivale a 0.01782 g de C H N , C H O

16 20 2 4 4 4

- Farmacodinamia. ( 15 )

Es efectivo en la "enfermedad por movimiento" o cinetosis, ya que actúa por antagonismo central de la acetilcolina. Presenta una inhibición competitiva reversible de la Histamina en los receptores H<sub>1</sub>, periféricamente inhibe muchas de las acciones de la Histamina en músculo liso y antagoniza la habilidad de la Histamina de incrementar la permeabilidad capilar y formar edemas y pápulas. A nivel del SNC es capaz de bloquear los efectos de la liberación de la Histamina por las neuronas histaminérgicas centrales.



- Farmacocinética. ( 12 )

Se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, se distribuye ampliamente por todo el organismo incluso, el Sistema Nervioso Central, el sitio principal de transformación metabólica es el hígado. Los efectos aparecen de 15 a 30 minutos después de la administración oral y son máximos en 1 o 2 horas.

- Usos. ( 12, 15, 16 )

Se emplea en la profilaxis y tratamiento de la "enfermedad por movimiento" o cinetosis. Se ha utilizado en las perturbaciones vestibulares como en la enfermedad de Meniere y otros tipos de vértigo. Así como en el tratamiento sintomático de diversas enfermedades alérgicas, donde su utilidad puede atribuirse al antagonismo con la Histamina endógenamente liberada.

- Toxicidad. ( 12 )

Aunque presenta un margen relativamente alto de seguridad, el envenenamiento agudo es común, y con frecuencia es causa de envenenamiento accidental en niños, o de intento de suicidio en adultos.

- Dosis. ( 14 )

La dosis usual es de 40 mg en adultos, al día pueden administrarse hasta 120 mg.

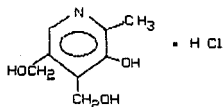
#### 2.1.4 CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA.

- Nombres químicos y sinónimos. ( 9, 14 )

Clorhidrato de 3-hidroxi-4,5-di-(hidroximetil)-2-metil-piridina.

Vitamina B<sub>6</sub>, Adermine clorhidrato, Hexabion clorhidrato.

- Fórmula desarrollada. ( 9 )



- Fórmula molecular. ( 9 )

C<sub>8</sub> H<sub>11</sub> N O<sub>3</sub> • HCl

- Peso molecular. ( 9 )

205.64

- Descripción. ( 9, 14 )

Polvo cristalino blanco o casi blanco, deliquescente, fácilmente se afecta por la luz, inodoro.

- pKa ( 17 )  
5.0 y 9.0

- Solubilidad. ( 9 )

Fácilmente soluble en agua, poco soluble en alcohol, casi insoluble en cloroformo y éter.

- Temperatura de fusión. ( 9 )

Alrededor de 205 °C con descomposición.

- Ensayos de identidad.

a) A 5 ml de una solución ( 1:200 ) de la muestra, agregar 5 gotas de solución 2 N de ácido nítrico y 2 ml de solución reactivo de nitrato de plata, se forma un precipitado blanco amarillento. ( 9 )

b) El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión de la muestra en parafina líquida presenta máximas solamente a las mismas longitudes de onda, que una preparación similar SRef de clorhidrato de piridoxina. ( 9 )

c) Colocar 1 ml de una solución que contenga 100 µg de la muestra por ml, en cada uno de dos tubos A y B respectivamente, agregar a cada tubo 2 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico, exhibe máximas y mínimas a las mismas longitudes de onda que una solución similar SRef de clorhidrato de piridoxina, la máxima absorbancia es alrededor de 278 nm y las respectivas absorptividades calculadas en la sustancia anhidra a la longitud de onda de máxima absorbancia a aproximadamente 278 nm, no difieren

en más de 3 por ciento. ( 9 )

- Ensayos de pureza.

Contiene no menos de 98.0 por ciento y no más del 100.5 por ciento. ( 9 )

a) Claridad de la solución. ( 2 )

Una solución al 5 por ciento en agua es clara o muy ligeramente opalescente.

b) Pérdida por secado. ( 2 )

Secado a peso constante entre 100° y 105 °C, pierde no más de 0.5 por ciento de su peso.

c) Sulfatos. ( 2 )

No más del 0.1 por ciento.

d) Metales pesados. ( 1 )

No más del 0.003 por ciento.

e) Residuo de la ignición. ( 1 )

No más del 0.1 por ciento.

- Valoración. ( 1 )

Disolver aproximadamente 400 mg de Clorhidrato de Piridoxina exactamente pesados, en una mezcla de ácido acético glacial y 10 ml de acetato mercurico SR, calentar ligeramente

hasta completa disolución de la muestra, enfriar a temperatura ambiente y adicionar 2 gotas de cristal violeta TS, y titular con solución valorada 0.1 N de ácido perclórico.

Desarrollar un blanco de determinación en la misma forma y hacer la corrección correspondiente.

Cada ml de la solución valorada 0.1 N de ácido perclórico equivale a 20.56 mg de  $C_8H_9NO_3$ , HCl

- Farmacodinamia. ( 12, 18 )

En el organismo la piridoxina es convertida a fosfato de piridoxal, el cual, actúa en el metabolismo como coenzima de una gran variedad de transformaciones metabólicas de aminoácidos, entre ellas: descarboxilación, transaminación, y racemización, así como en pasos enzimáticos del metabolismo del triptofano, los aminoácidos que contienen azufre y los hidroxil-aminoácidos.

- Farmacocinética. ( 12, 18 )

Es absorbida fácilmente del tracto gastrointestinal, aproximadamente el 10 por ciento es excretada en la orina sin modificación, y el 80 por ciento es excretada como ácido 4-piridóxico, formado por la acción de una aldehidooxidasa hepática sobre el piridoxal libre.

- Usos. ( 12, 14, 15, 18 )

Se emplea para el tratamiento de la neuritis que se ocasiona durante la terapia de la enfermedad de Wilson al administrarse penicilamina. Se administra profilácticamente a pacientes que reciben isoniazida o hidralazina, para evitar el desarrollo de neuritis periférica. Como la Piridoxina es esencial en la nutrición humana, se le incorpora a muchos preparados multivitamínicos de uso profiláctico. Es empleado en el tratamiento de algunas anemias, distrofias musculares, vómito del embarazo, normaliza el índice de la urea sanguínea, se le administra a mujeres con deficiencia en vitamina B6, debida a la ingesta de anticonceptivos orales.

- Toxicidad. ( 12 )

La piridoxina tiene poca toxicidad. Dosis orales muy elevadas ( 2 a 6 g / Kg ) producen convulsiones y muerte en ratas y ratones, pero dosis menores pueden tomarse a diario sin efectos evidentes. En el hombre, dosis orales de hasta 1 000 mg diarios, no han causado reacciones adversas, pero se han notado síntomas de dependencia en adultos que recibían sólo 200 mg diarios, seguidos de retiro.

- Dosis. ( 12, 14 )

El requerimiento de Piridoxina aumenta junto con la cantidad de proteína de la alimentación.

Para dejar un margen razonable de seguridad y permitir una ingesta diaria mayor a 100 g de proteína, se recomienda un nivel de 2.2 mg por día para hombres y 2.0 mg por día para mujeres.

Se emplean dosis de 20 a 200 mg diarios en pacientes con neuritis periférica ocasionada por el empleo de isoniazida u otras drogas.

## 2.2 FORMAS FARMACEUTICAS DE USO ORAL CON LIBERACION CONTROLADA.

Cuando se diseña un régimen de dosificación, el objetivo es alcanzar en un tiempo breve, el nivel terapéuticamente efectivo del medicamento, el cual se trata de mantener administrando el fármaco a los intervalos que sean necesarios, hasta la recuperación del paciente. Esto se consigue si se diseña un régimen de dosificación que tome debidamente en cuenta la dosis terapéutica del medicamento y la velocidad de eliminación de éste desde el organismo. ( 19 ) .

Los preparados de liberación sostenida, intentan desarrollar un esquema de entrega del medicamento al organismo, que produzca un nivel terapéuticamente efectivo, en la forma más rápida posible, y que luego esta concentración se mantenga durante un tiempo prolongado; en el caso de formas de administración oral, el período de tiempo esta relacionado a horas y depende críticamente del tiempo de residencia de la forma farmacéutica en el tracto gastrointestinal.

Las ventajas que presentan los preparados farmacéuticos de liberación sostenida resultan evidentes, si se considera el objetivo que persiguen, sin embargo se pueden mencionar además de algunas ventajas, las limitaciones de esta forma de dosificación:



Ventajas: ( 19, 20, 21 )

- 1.- El efecto clínico del medicamento se mantiene por un periodo más largo, por lo cual, se evitan los olvidos involuntarios, que pueden producirse en la administración de medicamentos en dosis a intervalos más cortos.
- 2.- Mejor complacencia del paciente, por ejemplo, durante las horas nocturnas, en que el enfermo debe dormir sin necesidad de despertarlo para administrarle el medicamento.
- 3.- Reducción del número de las dosis ya que la administración se hace a intervalos más largos.
- 4.- Reducción de efectos colaterales, ya que la concentración plasmática máxima es más baja.
- 5.- Mantener un nivel sanguíneo constante del medicamento, evita las fluctuaciones que se producen con la administración en varias dosis.
- 6.- Se reduce al mínimo la acumulación de principio activo en los tratamientos prolongados.
- 7.- Ya que la cantidad total de principio activo es reducida, se logra el efecto deseado con una mínima cantidad.

Limitaciones: ( 19, 20, 21 )

- 1.- La terminación de la terapia es en un tiempo más largo.
- 2.- Se tiene menos flexibilidad al ajustar regímenes de dosificación.
- 3.- Tiene un alto costo, debido a los procedimientos empleados en su manufactura.
- 4.- En caso de envenenamiento accidental, la efectividad de un antídoto es limitada.
- 5.- No todos los activos son buenos candidatos para una formulación de acción sostenida, debido a sus características intrínsecas, tales como: ( 22, 23 )

Característica limitante	Ejemplos de Activos que presentan la característica limitante
- Dependiente de la posición en el tracto gastrointestinal para una óptima absorción.	Riboflavina
- Absorbidas y excretadas rápidamente, con un tiempo de vida media corto (< 1 hora).	Penicilina G, Furosemda
- Con un tiempo de vida media largo (> 12 hr).	Diazepam
- Requieren de grandes dosis (> 1 g)	Sulfonamidas
- Con bajos índices terapéuticos.	Digitoxina
- Se requiere precisar la dosis del paciente en forma individual.	Anticoagulantes

### 2.2.1 CLASIFICACION. ( 19, 22 )

En la literatura farmacéutica, suelen encontrarse una gran variedad de nombres, para designar estos preparados, por ejemplo: Acción diferida, lenta entrega, acción prolongada, acción repetida, etc. Incluso estos términos suelen emplearse como sinónimos, en circunstancias en que los productos pueden basarse en sistemas muy diferentes de cesión y tener características de liberación también diferentes.

A continuación, se presenta una clasificación para formas farmacéuticas de acción controlada para uso oral, la cual toma en cuenta cuatro grupos.

- 1) Liberación prolongada.
- 2) Liberación sostenida.
- 3) Liberación retardada.
- 4) Acción repetida.

#### 1) Liberación prolongada.

Corresponde a las formulaciones en las cuales el principio activo se entrega inicialmente en la cantidad suficiente para alcanzar el efecto terapéutico, o en un exceso no dañino para el organismo, el principio activo se libera luego, en forma lenta a una velocidad no siempre igual a la de eliminación.

2) Liberación sostenida.

Son aquellos preparados que entregan inicialmente el principio activo, en cantidad necesaria para alcanzar el efecto terapéutico en forma rápida, y luego, en cantidad adecuada para que la velocidad de absorción sea igual a la de eliminación, durante un período prolongado.

3) Liberación retardada.

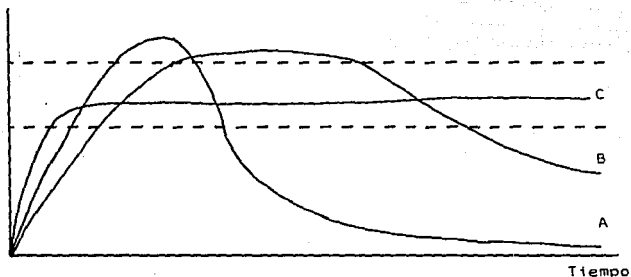
Son aquellas en las cuales, el principio activo no es entregado inmediatamente después de su administración, sino a un tiempo posterior, por ejemplo: Los productos con cubierta entérica, los cuales retardan la liberación del principio activo, hasta que la forma de dosificación llega a la parte superior del intestino, se adopta esta medida para proteger a los principios activos sensibles al jugo gástrico, o preservar la mucosa gástrica de los efectos secundarios locales.

4) Acción repetida.

Son aquellas formas farmacéuticas, que inicialmente proporcionan una dosis simple de principio activo, y a un tiempo posterior otra dosis similar.

Según las definiciones anteriores, la formulación de un preparado de acción sostenida, no es fácil de alcanzar, por lo que la mayor parte de los productos que se encuentran en el mercado, corresponden a los otros tres grupos.

Cantidad de Principio Activo en el Organismo



Relación de Principio Activo en el organismo contra Tiempo de tres tipos de dosificación. ( 19 )

- A.- Dosis simple.
- B.- Liberación prolongada.
- C.- Liberación sostenida.

Las líneas punteadas enmarcan la zona terapéutica del medicamento.

## 2.2.2 CONSIDERACIONES

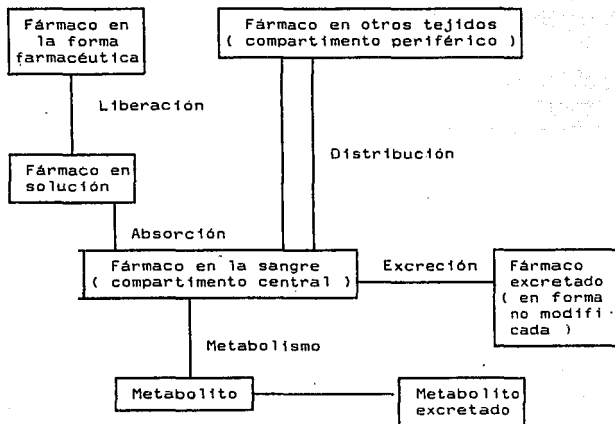
( 22 )

El desarrollo de una forma farmacéutica de liberación controlada incluye importantes consideraciones.

A continuación se muestran las consideraciones relacionadas con las propiedades fisicoquímicas y biológicas del principio activo, así como los factores paciente/enfermedad.

Factor	Consideraciones
- Propiedades Fisicoquímicas.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Solubilidad.</li><li>- Cantidad de dosis.</li><li>- Estabilidad.</li><li>- Tamaño molecular.</li><li>- Coeficiente de partición.</li><li>- pKa.</li><li>- Unión a proteínas.</li><li>- Tipo de forma farmacéutica.</li></ul>
- Propiedades Biológicas.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Características de absorción.</li><li>- Tiempo de vida media.</li><li>- Características de distribución.</li><li>- Duración de la acción.</li><li>- Margen de seguridad.</li><li>- Metabolismo de la droga.</li><li>- Ruta de la administración.</li><li>- Efectos colaterales.</li></ul>
- Paciente/enfermedad.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Si la terapia requerida es crítica o rutinaria.</li><li>- Edad y estado fisiológico del paciente.</li><li>- Si es necesario que el paciente permanezca en cama o no.</li><li>- Ruta de administración.</li><li>- Localización de la lesión.</li><li>- Duración de la acción del principio activo, que se desea obtener.</li></ul>

Después de ingerir una forma farmacéutica sólida, tienen lugar en el organismo los procesos siguientes: Liberación del principio activo, Disolución, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción, tal como se muestra en el esquema siguiente: ( 19 )



En este esquema, se observa que una vez administrado el fármaco, este ingresa a la sangre por un proceso de absorción, las condiciones del proceso de absorción especialmente la velocidad, dependen de las características fisicoquímicas del sitio de absorción y de las propiedades del principio activo.

Aún cuando se han descrito mecanismos de absorción tales como la difusión facilitada, el transporte activo y la pinocitosis, la absorción de los medicamentos se efectúa en su mayoría por un proceso de transporte pasivo, o simple difusión.

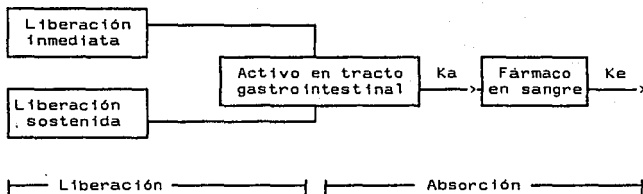
Las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, son de gran importancia en el proceso de absorción. Cuando se trata de fármacos que son ácidos o bases débiles, la absorción es influida por la relación existente entre el pKa del principio activo y el pH del medio. El pH del medio también puede influir en la solubilidad del medicamento que se administre.

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

En forma casi simultánea con la distribución comienzan a producirse en el organismo los procesos de metabolismo y excreción. La biotransformación o metabolismo de los medicamentos se verifica esencialmente en el hígado. La excreción del principio activo, en forma inalterada o sus metabolitos es principalmente por vía urinaria. ( 19 )



Un modelo sencillo para calcular la dosis necesaria en una formulación de acción sostenida es el siguiente: ( 22 )



En este modelo se observa que tanto una forma de acción sostenida como una forma convencional, siguen el mismo camino, sólo difieren en que una forma farmacéutica convencional al liberar su contenido rápidamente, alcanza la concentración terapéutica de una forma rápida. Mientras que una formulación con liberación sostenida, mantiene la concentración del principio activo al nivel terapéutico, de acuerdo a la siguiente relación:

$$\frac{\text{Proporción del Principio Activo liberado.}}{\text{Proporción del Principio Activo eliminado.}} = \frac{\text{Proporción del Principio Activo eliminado.}}{\text{Proporción del Principio Activo liberado.}} \quad (1)$$

La absorción se produce por difusión, la cual es un proceso de primer orden.

Dado que, muchos activos son eliminados por un proceso de primer orden, se puede expresar:

$$\text{Proporción del Principio Activo eliminado} = D K_e \quad (2)$$

Donde, D es la dosis de mantenimiento y Ke es la constante de eliminación, la cual está relacionada con el tiempo de vida media del principio activo, por la expresión:

$$K_e = \frac{0.693}{t_{1/2}} \quad (3)$$

De tal forma que:

$$\frac{\text{Proporción de Principio Activo eliminado}}{\text{Activo eliminado}} = \frac{(D)(0.693)}{t_{1/2}} \quad (4)$$

Combinando la ecuación (1) y (4) se obtiene:

$$\frac{\text{Proporción de Principio Activo liberado}}{\text{Activo liberado}} = \frac{(D)(0.693)}{t_{1/2}} \quad (5)$$

De tal forma que, si se desea dosificar la administración del activo a un determinado intervalo de tiempo, se obtiene que:

Cantidad de activo necesario en la formulación = (Proporción de Activo eliminado)(T)

Por lo tanto:

$$\text{Cantidad de activo necesario en la formulación} = \frac{(D)(0.693)(T)}{t_{1/2}}$$

Usando este modelo, se puede calcular la cantidad de principio activo necesario para calcular la dosis de una formulación de acción sostenida a un tiempo determinado. ( 22 )

En la formulación de preparados de acción sostenida que se administran por vía oral, es necesario tener en cuenta las características de absorción del medicamento, y será un requisito fundamental que pueda absorberse en una amplia zona del tracto gastrointestinal.

La absorción gastrointestinal puede producirse a lo largo de todo el tubo digestivo, incluyendo el estómago, intestino delgado y el intestino grueso. Sin embargo, hay variaciones notables en la absorción que se produce en las distintas partes del tubo digestivo.

#### Características del tracto gastrointestinal. ( 22 )

Unidad Anatómica	Longitud ( cm )	Diámetro ( cm )	pH	Presenta vellosidades
Boca	15 - 20	10	6.4	no
Esófago	25	2.5	5.0 - 6.0	no
Estómago	20	15	1.0 - 3.0	no
Duodeno	25	5	5.0	si
Yeyuno	300	5	6.0 - 7.0	si
Ileon	300	2.5 - 5.0	7.6	si
Intestino grueso	200	2.5 - 7.0	7.5 - 8.0	no

La absorción en el tracto gastrointestinal depende de la velocidad de disolución del medicamento, y por lo tanto, de los diversos factores que lo afectan, por ejemplo: pH, enzimas, características de superficie.

Sin embargo, obtener la liberación de la sustancia activa controlada por un sistema de velocidad constante que sea independiente del medio circundante, es difícil de alcanzar debido a las variaciones individuales que se producen al emplear en el cálculo el valor promedio de la constante de eliminación, y además de que el tiempo de tránsito de vehículos activos sólidos puede estar sometido a fuertes oscilaciones. De tal manera que, obtener una forma farmacéutica con liberación sostenida es difícil de lograr, siendo en su mayoría de liberación prolongada. ( 22 )

### 2.2.3 TECNOLOGIA.

Los métodos para lograr que el principio activo puesto en una forma de dosificación tenga una acción controlada, se clasifican en tres categorías.

- 1) Métodos Biológicos.
- 2) Métodos Químicos.
- 3) Métodos Farmacéuticos.

#### 1) Métodos Biológicos. ( 19 )

Dentro de esta categoría se encuentran:

- a) Los que modifican el tiempo de vida media.
- b) Inhibición enzimática.

#### a) Modificando el tiempo de vida media

Aquellos principios activos que tienen un tiempo de vida media relativamente corto, es necesario administrarlos frecuentemente para mantener una concentración terapéutica en el paciente.

El tiempo de vida media corto en los principios activos es usualmente atribuible a que presentan una rápida eliminación, por lo tanto, reduciendo la eliminación se prolonga el tiempo de vida media, esto se puede lograr incrementando la reabsorción renal, o bien, reduciendo la excreción renal del principio activo.

La reabsorción renal de los principios activos eliminados por difusión pasiva, puede incrementarse alterando el pH urinario, para lograr minimizar la ionización del principio activo en la orina, por ejemplo, la administración de cloruro de amonio (el cual causa acidosis urinaria), favorece la reabsorción de principios activos ácidos, mientras que la administración de bicarbonato de sodio (el cual causa alcalosis urinaria), favorece la reabsorción de principios activos básicos.

b) Inhibición Enzimática.

Esta estrategia es empleada para aquellos principios activos que son inactivados por la actividad enzimática, la biotransformación de un principio activo puede hacerse más lenta inhibiendo la acción de la enzima que lo inactiva, de tal forma que administrando un segundo principio activo que tenga afinidad por la enzima inactivadora, se reduce la capacidad de la enzima para inactivar al principio activo de interés.

Como puede notarse, los métodos biológicos requieren de la administración de un segundo principio activo, el cual frecuentemente tiene efectos indeseables, por lo cual, estos métodos tienen una limitada aplicación y están restringidos a usarse bajo estricto control médico.

## 2) Métodos Químicos. ( 19 )

Estos métodos involucran la modificación química de la molécula del principio activo de interés

### a) Formación de complejos o sales poco solubles.

Se puede modificar la molécula de la forma que se modifique su absorción sin alterar el efecto terapéutico, o se puede formar un derivado que sea inerte, pero que se regenera al compuesto original al someterse a los fluidos corporales, por lo tanto, si el proceso de regeneración es lento, la duración de la acción es prolongada.

El más conocido de estos procedimientos, es la formación de tanatos de algunos principios activos que son bases orgánicas. Este procedimiento puede ser aplicado a principios activos que tengan grupos amino, y que formen compuestos insolubles con el ácido tánico, una vez obtenido el complejo principio activo-ácido tánico al estado de polvo, este puede emplearse en cualquier tipo de forma farmacéutica, ya sea un comprimido o en una cápsula. En el tracto gastrointestinal, el complejo reacciona con los electrólitos disueltos en el medio y cede paulatinamente, el principio activo dejándolo en condiciones de ser absorbido.

b) Empleo de resinas de intercambio iónico. ( 19 )

En estos métodos se trata de formar un complejo de la resina con el principio activo y su posterior disociación en el tracto gastrointestinal con la consiguiente liberación del principio activo. El complejo insoluble formado, cede el principio activo lentamente por doble descomposición, al producirse el intercambio entre el principio activo y algún ión adecuado. La velocidad de cesión del principio activo desde la resina dependerá, por lo tanto, de la velocidad de difusión de ambos iones, es decir, del principio activo que abandona la resina y del ión que entra a reemplazarlo, para que se produzca el intercambio es necesario que haya una concentración relativamente alta del ión en el sitio de liberación.

Esto es normal que ocurra en el tracto gastrointestinal, en el cual existen electrólitos en cantidad más o menos constante. Además el proceso se ve favorecido por el hecho de que el principio activo se va absorbiendo a medida de que es liberado, de manera que el ión que sale de la resina, es removido en forma constante.



### 3) Métodos Farmacéuticos.

Estos métodos pueden agruparse tomando en cuenta los principios fisicoquímicos en los cuales se basa la formulación y la liberación del principio activo desde la forma farmacéutica.

#### a) Recubrimiento de Tipo Entérico. ( 19 )

El objetivo de estas preparaciones es la de evitar la descomposición de aquellos principios activos alterables en el medio estomacal o para impedir su acción irritante sobre la mucosa gástrica, con un recubrimiento entérico, se logra que una forma farmacéutica pueda pasar inalterada a través del estómago y disolverse en el intestino delgado produciendo la liberación del principio activo.

Estas preparaciones se formulan fundamentalmente como las convencionales y se proveen además de una capa resistente al jugo gástrico. Este tipo de capa no se disuelve en jugo gástrico fuerte o débilmente ácido, sino más bien en el jugo intestinal casi neutro, de modo que el principio activo no queda libre para la absorción hasta llegar a la parte superior del intestino.

Este principio, también puede emplearse para entregar el principio activo de una manera programada, de tal forma que, se libere una parte del principio activo cuando la forma farmacéutica llegue al estómago, y una segunda

porción se libere en el intestino, luego de disolverse la cubierta entérica. De tal forma que estos productos se presentan generalmente en forma de grageas y consisten en dos dosis del principio activo en una sola forma farmacéutica. La dosis de liberación inmediata que debe ser liberada en el estómago, se encuentra en la cubierta de la gragea, y la dosis de mantenimiento o segunda dosis en este caso, se halla en el núcleo, el cual fue protegido con una cubierta entérica.

b) Gránulos Recubiertos. ( 19, 23 )

Mediante el recubrimiento, puede mejorarse la resistencia al roce, la estabilidad de almacenamiento, el aspecto, la caracterización, el sabor y la tolerancia.

Los recubrimientos tienen la ventaja de su poco espesor, y permiten programar la liberación de la sustancia activa mediante la elección del tipo de cubierta conveniente en cada caso. Este tipo de preparados está constituido por una mezcla de corpúsculos o microesferas. La dosis inicial es entregada por microesferas con distintos grados de recubrimiento, la forma más usual de emplear estas microesferas es colocarlas en cápsulas de gelatina dura.

Con este tipo de preparado, constituido por corpúsculos pequeños con distintos grados de recubrimientos, es posible aproximarse bastante a una formulación que sea capaz de entregar el principio activo en la forma señalada por la teoría, es decir, liberando inicialmente una dosis que permita alcanzar el nivel terapéutico y luego mantenerlo produciendo una liberación, de modo que la velocidad de absorción, sea igual a la de eliminación del principio activo. La liberación sostenida se favorece por el hecho de que existe la posibilidad de producir gránulos con una gama bastante amplia de grosor de recubrimiento, y además, porque al estar el principio activo dividido en partículas pequeñas, su tránsito a través del tracto gastrointestinal se produce en mejor forma y su distribución a lo largo de él, puede permitir una cesión regular del principio activo. De esta manera, se disminuyen los riesgos de una absorción mala o irregular en el tracto gastrointestinal, que pudiera originarse porque la forma farmacéutica quedara resagada o retenida en lugares en los cuales, la cesión del principio activo no se produzca en forma adecuada, o que sea en mal sitio de absorción para el principio activo en cuestión.

Las microesferas se preparan por recubrimientos de gránulos que contienen el principio activo, estos núcleos tienen un tamaño correspondiente a malla 12 a 14. Una forma

de obtener los núcleos que sirven de base para la preparación de las microsferas consiste en utilizar pequeños gránulos de azúcar o de otras sustancias inertes y recubrirlos con soluciones adhesivas tales como; jarabes, soluciones de gelatina, polivinilpirrolidona, derivados de celulosa u otras sustancias de este tipo, que contienen disuelto el principio activo que se va a incorporar.

c) Erosión Lenta. ( 19 )

Los preparados de acción prolongada que se basan en este principio, contienen el principio activo mezclado con sustancias no absorbibles en el tracto gastrointestinal, por ejemplo; algunas sustancias grasas, ceras sólidas de alto peso molecular y de punto de fusión elevado. De esta manera, el principio activo se está cediendo paulatinamente, a medida que los líquidos del tracto gastrointestinal van erosionando poco a poco la masa del comprimido.

La velocidad de cesión del principio activo desde el núcleo de lenta erosión, se puede regular efectuando mezclas de sustancias hidrosolubles que permitan acelerar la cesión.

d) Empleo de Gomas y Coloides Hidrofílicos. ( 19 )

Este método emplea una mezcla del principio activo, con algunas gomas u otras sustancias coloidales hidrofílicas

no digeribles para fabricar comprimidos. En este tipo de preparados, la goma o sustancia coloidal hidrofílica se mezcla íntimamente con el principio activo, de modo que éste quede incluido en una especie de matriz del gel hidrofílico. Cuando la tableta se humecta con los jugos digestivos del tracto gastrointestinal, se forma en su superficie una barrera coloidal a través de la cual, difunde paulatinamente el principio activo. Las sustancias que se emplean en este tipo de preparados son: goma arábiga, alginatos, derivados de celulosa como metil, etil, carboximetil, etc.

e) Comprimidos de Matriz Plástica. ( 19 )

Los preparados de este tipo, están formados por comprimidos fabricados con algún tipo de sustancia plástica que tiene incluido en su interior el principio activo. De esta manera, la tableta forma una especie de matriz plástica, que en su paso a través del tracto gastrointestinal, libera el principio activo en forma lenta, cediéndolo gradualmente al medio líquido y dejándolo en esta forma, en condiciones para la absorción.

En la fabricación de estos comprimidos se emplean diversos tipos de polímeros, que le dan estructura rígida, y además algunas otras sustancias coadyuvantes que sirven para re-

gular la liberación del principio activo, llamados canalizadores, que son sustancias muy solubles en agua, que al disolverse aumentan la porosidad de la matriz permitiendo el ingreso de los líquidos que realizan la extracción del principio activo desde el interior de ella.

f) Sistema Osmótico. ( 22, 25 )

Este sistema consiste en un núcleo conteniendo el principio activo recubierto con una laca impermeable, la cual, presenta un pequeño orificio (0.3 mm de diámetro aprox.) producido por un rayo láser. A través de este orificio, el fluido gastrointestinal llega al núcleo y disuelve el principio activo. Después de establecerse la presión osmótica en el interior del núcleo, la solución saturada de principio activo se bombea hacia afuera, a una velocidad constante, la velocidad de liberación empieza a disminuir lentamente, cuando la solución del principio activo se diluye en el interior del sistema.

#### 2.2.4 EVALUACION. ( 19, 23, 24

Para controlar y evaluar las características de cesión de los preparados de acción sostenida de uso oral, se efectúan controles "in vitro" e "in vivo".

Las pruebas "in vitro", son de gran utilidad durante la etapa de desarrollo y diseño de la formulación, y también se emplean en la Industria Farmacéutica, como pruebas de control de calidad, para asegurar la uniformidad de las características del producto en las diferentes partidas de fabricación.

Las pruebas "in vivo", permiten controlar la cesión del principio activo en el organismo, también sirven para asegurar o medir la inocuidad o efectividad de la forma farmacéutica, y en conjunto con las evaluaciones clínicas, permiten establecer la efectividad terapéutica, así como, los límites adecuados de cesión, que pueden controlarse por procedimientos "in vitro".

##### a) Controles "in vitro".

Los controles "in vitro", deben considerarse como procedimientos que permiten conocer la cantidad de principio activo cedido por la preparación en la unidad de tiempo, en las condiciones experimentales que se han establecido. Es necesario tener en claro, que se trata de sistemas de con-

control más que de procedimientos de simulación del fenómeno de absorción.

Ningún método de control "in vitro", tiene valor en sí mismo, a menos que controle efectivamente el mismo fenómeno, del cual depende la liberación del principio activo "in vivo".

El ensayo "in vitro", tiene importancia como control de la fabricación, para asegurar que las diversas partidas de un mismo producto, corresponden efectivamente a los requisitos de cesión, que se han programado para esta forma farmacéutica.

Los procedimientos "in vitro" consisten, en mantener la forma farmacéutica durante un tiempo determinado, en un medio líquido con características especiales de pH, concentración de electrolitos y contenido enzimático. El producto se mantiene en movimiento, mediante la introducción de un sistema apropiado de agitación, y a una temperatura similar a la del organismo (37°C.). La valoración del principio activo cedido al medio líquido, a los diferentes intervalos de tiempo, pueden efectuarse sobre el residuo remanente en la forma farmacéutica a dichos intervalos, obteniéndose la cantidad de principio activo liberado por diferencia, o bien, valorando el principio activo



directamente en el líquido de extracción a los tiempos señalados.

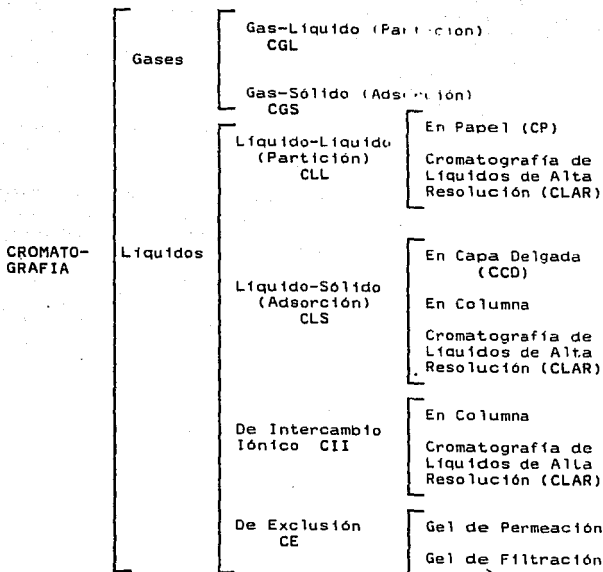
No existe un procedimiento universal, que sea aplicable a cualquier tipo de forma farmacéutica de acción controlada, por lo tanto, los aparatos y equipos utilizados, dependen de las características del producto y del sistema de liberación del principio activo desde la forma farmacéutica.

## 2.3 CROMATOGRAFIA.

### 2.3.1 CLASIFICACION. ( 27 )

La cromatografía es un método físico que permite separar, aislar, e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria.

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas, y con los diferentes mecanismos de separación, se tienen distintos tipos de cromatografía.



CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS ( 28 )

La cromatografía de líquidos puede desarrollarse en diferentes sistemas, en función de la forma física de la fase estacionaria. En la cromatografía en capa delgada y en la cromatografía en papel, la fase estacionaria se extiende en forma de capa. En la cromatografía en columna, la fase estacionaria es empacada en una "columna".

La cromatografía de líquidos en columna, basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, puede clasificarse en cuatro tipos: ( 28 )

- 1) Cromatografía de Adsorción.
- 2) Cromatografía de Partición.
- 3) Cromatografía de Intercambio Iónico.
- 4) Cromatografía de Exclusión.

#### 1) Cromatografía de Adsorción.

En la cromatografía de adsorción, la fase estacionaria es un adsorbente, y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

#### 2) Cromatografía de Partición.

En la cromatografía de partición, la separación no se basa en la adsorción, sino en un reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

#### 3) Cromatografía de Intercambio Iónico.

En este tipo de cromatografía, el lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con una carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables; cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica, y por tanto, más tiempo tardará en ser eluida; la fase móvil es una solución reguladora acuosa, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

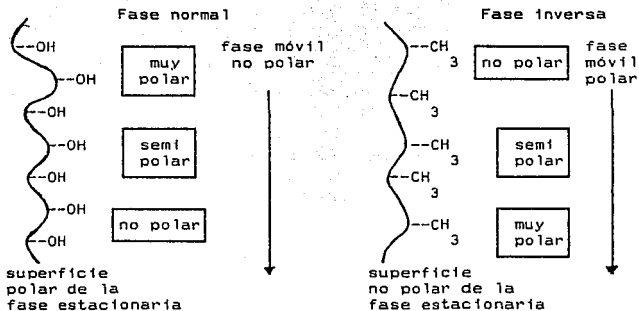
#### 4) Cromatografía de Exclusión.

En este tipo de cromatografía, se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre cierto límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

Debido a que no siempre puede determinarse, cual de los procesos implicados si el de adsorción o el de reparto desempeña el papel más importante, se definen dos o más tipos, según sea la polaridad relativa de las dos fases, de esta forma surge la Cromatografía en Fase Normal y la Cromatografía en Fase Inversa.

En la Cromatografía en Fase Normal, el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar ( p. ej. sílice ) y la fase móvil es no polar ( p. ej. n-hexano, tetrahidrofurano ). Las muestras polares quedan retenidas durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares

La Cromatografía en Fase Inversa es exactamente lo contrario, es decir, el lecho estacionario es de naturaleza no polar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o algún alcohol. En este caso, cuanto más no polar sea la muestra, mayor será su retención.



En la ilustración se indica el orden de elución de los distintos componentes de una muestra, en función de sus diferentes polaridades. ( 28 )

También se puede considerar una clasificación, de acuerdo a la composición de la fase móvil: ( 28 )

- a) Elución isocrática.- Si se mantiene la composición de la fase móvil constante.
- b) Elución por gradiente.- Si se varía la composición de la fase móvil a lo largo de un cromatograma.

### 2.3.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía de líquidos clásica, presenta el inconveniente de tiempos de elución prolongados, lo cual ha motivado a mejorar la técnica de esta cromatografía, para lo cual se han empleado partículas de mucho menor tamaño, que han requerido de mayores presiones de entrada, y de nuevos detectores capaces de operar a bajo caudal y de detectar pequeñas cantidades de sustancias; como resultado de estos implementos surge lo que actualmente se conoce como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ( CLAR ).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se caracteriza por: ( 27, 28, 29 )

- 1.- Columnas reutilizables de diámetro pequeño (2-5 mm).
- 2.- Rellenos de columna de partículas muy pequeñas (5-50  $\mu$ m)
- 3.- Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil.
- 4.- Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de inyectar grandes cantidades.
- 5.- Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y de detectar cantidades muy pequeñas.
- 6.- Instrumentos normalizados y automatizados.
- 7.- Análisis rápidos.
- 8.- Alta resolución.
- 9.- Cantidad mínima detectable del orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-12}$  g.

### 2.3.2.1 CROMATOGRAFIA DE PARES IONICOS ( 28, 30, 31 )

La cromatografía de formación de pares iónicos, permite la separación de muchos compuestos que están demasiado ionizados para separarlos mediante métodos normales de adsorción o partición, pero son demasiado insolubles en agua, para ser analizados por las técnicas convencionales de intercambio iónico.

La formación de pares iónicos, puede emplearse para la separación de muestras que contengan componentes iónicos fuertes, débiles y no iónicos, así como para aquellas muestras que contengan tanto ácidos como bases.

La formación de pares iónicos en la actualidad se efectúa preferentemente sobre columnas de fase inversa, con fases enlazadas permanentemente. En general, estas columnas son las de mayor eficacia para la separación de compuestos no iónicos puesto que el mecanismo primario de la separación depende de las diferencias de solubilidad, y por lo tanto, de la partición entre la fase móvil hidrofílica y la fase estacionaria lipofílica. La presencia en éstos sistemas de grupos iónicos, normalmente interfiere con la solubilidad, en el caso de ácidos y bases débiles con valores de  $pK_a$  comprendidos entre 2 y 8, puede suprimirse esta ionización, en ácidos y bases fuertes con valores de  $pK_a$  fuera del intervalo anterior, no puede suprimirse fácilmente. La finalidad de la formación de



pares iónicos, es añadir un segundo ion al eluyente que se combine con los iones de la muestra enlazándose fuertemente a ellos por formación de un par iónico neutro, que ya sufrirá los procesos normales de distribución por reparto, adsorción, etc., entre las fases estacionaria y móvil. A partir de este punto, los tiempos de retención se consiguen utilizando las técnicas habituales en fase inversa, tales como el ajuste de la proporción de disolvente orgánico e inorgánico, etc.

La formación de pares iónicos puede emplearse también, para modificar los iones de la muestra, de modo que los pares iónicos así formados, participen en el proceso de intercambio iónico. Por último, la tercera variante de la técnica consiste en utilizar la cromatografía de pares iónicos para modificar la fase estacionaria. En este caso, el contraíon se adsorbe sobre el relleno de la columna, a continuación los iones de la muestra de signo contrario, se unirán al nuevo contraíon superficial. Se necesita un exceso de contraíones en la fase móvil, para mantener una concentración constante de contraíones con la superficie de la fase estacionaria, y para que contribuyan al proceso de la distribución.

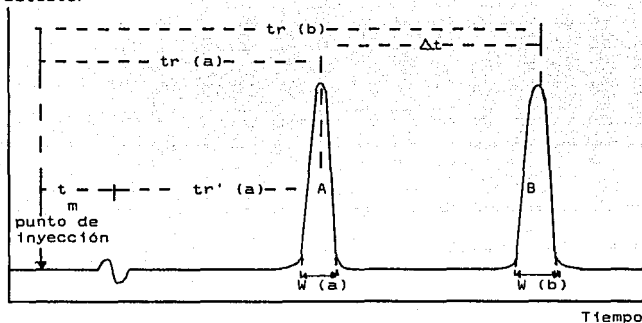
En todas estas variantes, los parámetros que se pueden ajustar para conseguir un amplio margen de selectividad son: el tipo y la concentración del contraíon, el pH, la temperatura de la columna y el tipo y la composición de la fase móvil.

La fase estacionaria más ampliamente utilizada en la cromatografía de formación de pares iónicos es la C-18 (octadecilsilano). Las muestras básicas normalmente se analizan usando alquilsulfonatos sódicos, por ejem. pentansulfonato sódico, con pH=3 aproximadamente ajustado con ácido acético glacial. Otros contraiones de uso frecuente son laurilsulfonato y dioctilsulfocianato sódico, los análisis se llevan a cabo a valores bajos de pH (2.5 - 3.5). Normalmente las muestras ácidas se analizan con fosfato de tetrabutilamonio, que proporciona un pH de 7.5 aproximadamente. ( 28, 30, 32 )

Durante el desarrollo de un cromatograma, la fase móvil arrastra a las moléculas de la muestra, a través del lecho de la fase estacionaria. Durante el trayecto, las distintas moléculas de la muestra son retardadas por la fase estacionaria, en función de la interacción entre los componentes de la muestra y las fases estacionaria y móvil. De tal forma, que los componentes de la muestra, empiezan a separarse uno de otro en bandas diferentes, mientras que la concentración de la muestra en la banda inicial ( inyector ) es uniforme, posteriormente sigue en el caso ideal, un perfil de distribución normal. Como resultado de todo ello, el registro de la concentración en función del tiempo a la salida de la columna, da lugar a un pico cuya forma es la de una curva gaussiana.

Los picos gaussianos que representan el número de moléculas eluidas frente al tiempo, constituyen un cromatograma, tal como se muestra en la siguiente figura: ( 27 )

Respuesta del detector



Los parámetros a evaluar en un cromatograma son: ( 27 )

- Tiempo de retención ( $tr$ ).- Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna, y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema, hasta que se obtiene el punto máximo de la señal.
- Tiempo muerto ( $t_m$ ).- Es el tiempo requerido para eluir una sustancia no retenida en la columna.
- Tiempo de retención ajustado ( $tr'$ ).- Es la diferencia entre el  $tr$  y  $t_m$ , es decir, el  $tr$  es el tiempo total de permanencia en la columna,  $t_m$  es el tiempo que la sustancia permanece en la fase móvil; por lo tanto,  $tr'$  es el tiempo que la sustancia permanece retenida en la fase estacionaria

$$tr' = tr - t_m$$

- Anchura de la base del cromatograma (Wb).- Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica. Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

- Número de platos teóricos (N).- Indica la capacidad de la columna para proporcionar picos estrechos y bien separados, mientras mayor sea N mayor número de platos teóricos tendrá la columna y por consiguiente será de mayor eficiencia o capacidad para la separación de los componentes.

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

Donde  $t_r$  y  $W_b$  se expresan en las mismas unidades (tiempo, volumen, distancia, etc.).

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

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

Donde  $L$  es la longitud de la columna y  $N$  el número de platos teóricos. Si el valor de AEPT es pequeño, es mayor el número de platos por unidad de longitud, y por lo tanto, la columna será más eficiente.

- Coeficiente de distribución o de reparto (K).- Se expresa por:

$$K = \frac{\text{cantidad de muestra/mL de fase estacionaria}}{\text{cantidad de muestra/mL de fase móvil}}$$

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

- Relación de capacidad (K').- Es una medida de la retención de un componente por la fase estacionaria, y es característico para una columna dada.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{\text{Tiempo en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo en la fase móvil}}$$

- Resolución (R).- Indica la separación entre dos picos adyacentes en un cromatograma.

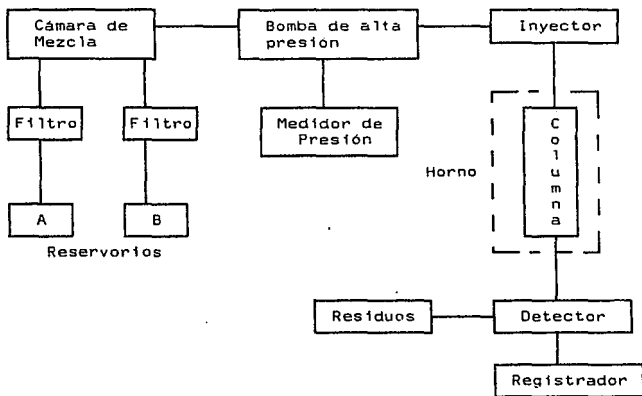
$$R = \frac{2 \left[ \frac{t_r - t_r}{2} \right]}{W_a + W_b}$$

- Selectividad ( $\alpha$ ).- Describe la retención relativa de los componentes en la fase estacionaria, es decir, que tanto se han separado los picos entre sí, sin tomar en cuenta la amplitud de los mismos.

$$\alpha = \frac{t_r' \quad 2}{t_r' \quad 1}$$

Valores elevados de  $\alpha$  significa mejores separaciones.

## 2.3.4 EQUIPO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION



Esquema de un Cromatografo de Líquidos de Alta Resolución ( 28 )

### 2.3.4.1 RESERVORIOS ( 28, 29 )

Su objetivo es contener los disolventes que se emplean como fase móvil, su boca será del menor diámetro posible a fin de evitar la evaporación, lo cual alteraría la composición de la fase móvil en caso de que uno de los componentes fuera más volátil que el resto.

El reservorio debe taparse de manera conveniente: a través del tapón va el tubo que conduce la fase móvil, este tubo succionador de acero o teflón, lleva en su extremo un filtro que garantiza la limpieza física del disolvente.

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

La fase móvil a emplear debe estar libre de burbujas; para eliminar las burbujas del sistema de solventes pueden seguirse los siguientes métodos. ( 28 )

- Colocar el recipiente del líquido en un baño de ultrasonido o introducir en él una sonda ultrasónica.
- Hacer burbujear una suave corriente de helio a través del líquido; el helio tiene la propiedad de desplazar otros gases de la solución.
- Calentar el líquido hasta ebullición.
- Conectar el líquido a una fuente de vacío; como medida preventiva utilizar frascos de paredes gruesas.

#### 2.3.4.2 BOMBA CROMATOGRÁFICA ( 29 )

Se entiende por bomba cromatográfica, a aquel dispositivo capaz de proporcionar a la fase móvil, la presión necesaria para que, operando al flujo o velocidad precisa, atraviése la columna cromatográfica.

Los requerimientos que debe cumplir un sistema de bombeo para CLAR son:

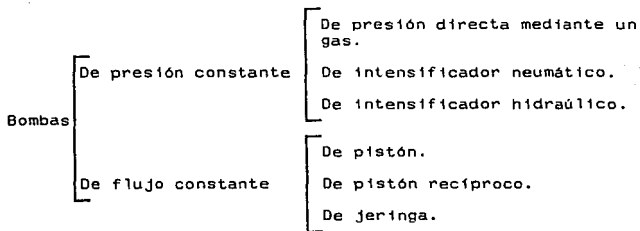
- El sistema de bombeo debe estar fabricado con materiales químicamente inertes a la fase móvil.



- Debe ser capaz de operar a la máxima sensibilidad del detector, y por tanto, debe estar exento de pulsaciones o tener un amortiguador que las controle.
- Debe suministrar caudales apropiados al diámetro interno de las columnas más eficientes ( de 0.5 a 6.0 ml/min ).
- Debe ser capaz de suministrar presiones de por lo menos 500 hasta 4000 psi.

Las bombas cromatográficas pueden clasificarse en dos tipos:

( 29 )



Como se observa, hay dos tipos de bombas cromatográficas:

- Aquellas que mediante un dispositivo generalmente basado en el empuje constante que ejerce un gas ( bombas de presión constante ), mueven la fase móvil por la columna, dependiendo el flujo de la fase móvil, de la resistencia que a su paso opone la columna.
- Aquellas que modifican su presión, para alcanzar y mantener un flujo determinado ( de flujo constante ).

Las principales ventajas de la mayoría de las bombas de presión constante son: su simplicidad, costo y la ausencia de pulsaciones que da lugar a líneas de base suave, sin embargo, debe controlarse el caudal con cuidado y constantemente. El caudal puede variar, al cambiar la viscosidad del disolvente a causa de cambios de temperatura, o cuando se acumulan en la columna, componentes de la muestra no disueltos o partículas desprendidas del material del septum, así como al sedimentarse el relleno de la columna.

La ventaja principal de las bombas de flujo constante, es su inherente capacidad de repetición de volúmenes de elución y áreas de picos, independientemente de la caída de presión de la columna, ocasionada por los posibles cambios de viscosidad o del bloqueo, o sedimentación ocasionales de la columna, hasta el límite de presión de la bomba.

Mantenimiento y cuidado de las bombas cromatográficas. ( 28 )

- La fase móvil deberá ser destilada en vidrio y/o filtrada a través de filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- El filtro que se encuentra en el extremo del tubo succionador, deberá ser limpiado constantemente o reemplazarlo, para evitar que las partículas entren a la cámara de bombeo.
- No deben emplearse materiales corrosivos.
- Al emplear fases móviles que contengan sales, éstas no deben permanecer en la bomba por largos periodos; al termi-

nar el análisis, se debe pasar agua pura a través de todo el sistema ( bomba, columna, inyector detector ).

- Evitar que la bomba trabaje en seco ( sin fase móvil ), por que se ocasiona la abrasión de las partes constituyentes de la cámara de bombeo.
- Los disolventes deberán ser degasificados para optimizar la precisión de la bomba.

#### 2.3.4.3 SISTEMAS DE INYECCION DE MUESTRAS ( 28, 29 )

La principal consideración en el diseño de un sistema de inyección de muestras, es la necesidad de proporcionar una zona de poco volumen, completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra y la dilución exponencial.

Los sistemas de inyección, son básicamente de cuatro tipos:

- Septum y jeringa.
- Sistemas de válvulas.
- Resistencia hidrodinámica.
- Sistemas automáticos.

#### 2.3.4.4 COLUMNA CROMATOGRAFICA

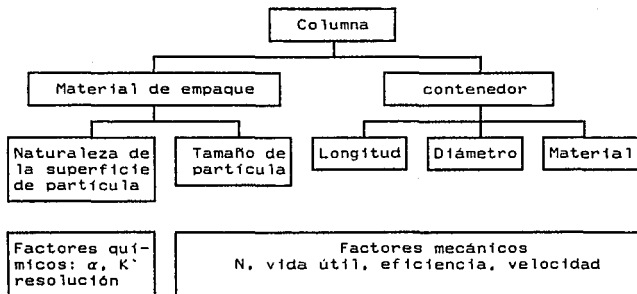
Básicamente, la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones.

Los avances en la tecnología de columnas, puede resumirse como sigue: ( 27 )

- Uniformidad de tamaño de partículas.
- Elaboración de partículas de tamaño muy reducido.

- Refinamiento en los procesos de relleno de las columnas.
- Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida.

Los componentes de la columna y su contribución al funcionamiento cromatográfico, se presentan a continuación.



Existen básicamente tres tipos de materiales de empaque:

- Gel de Sílice.
- Gel de sílice modificada químicamente en la superficie con grupos orgánicos diferentes, y por lo tanto, con comportamiento de selectividad específica.
- Alúmina.

Los materiales de empaque de las columnas utilizadas en CLAR deben cumplir con los siguientes requisitos :

- Estabilidad estructural.
- Grandes superficies de contacto.
- Una capa fina de absorbente distribuida uniformemente.
- Superficies con estructuras abiertas, que sean de fácil

acceso a la fase móvil.

- Resistencia para ser comprimidas por presiones altas.

#### 2.3.4.5 TEMPERATURA DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA. ( 28 )

La temperatura es un parámetro muy importante en cromatografía de líquidos, probablemente tan importante como el caudal o la polaridad del disolvente.

En la cromatografía de líquidos se emplea por varias razones:

- Para disminuir la viscosidad de la fase móvil, y lograr así presiones menores y aumento en la transferencia de masa de los componentes de la muestra entre las fases móvil y estacionaria.
- Para aumentar la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria y obtener así una mayor eficiencia global del equipo.
- Para aumentar la velocidad de migración iónica en los sistemas de intercambio iónico, con lo que se obtiene una mayor frecuencia de intercambio por unidad de longitud de la columna.

El empleo de temperatura en la columna, presenta la siguiente limitación:

- Al incrementar la temperatura disminuye el factor de capacidad, el cual a su vez influye sobre la eficiencia que debe tener la columna para lograr una determinada separación. En general, cuanto menor sea el factor de capacidad, mayor número de platos teóricos se precisará.

Sin embargo, independientemente del hecho de que se necesiten o no temperaturas elevadas, en muchos casos es conveniente el

control de temperatura, debido a que en algunas columnas la eficiencia puede variar con pequeños cambios de temperatura ambiente, del orden de 2° - 4°C.

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

#### 2.3.4.6 DETECTORES.

El detector es un dispositivo capaz de monitorear en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que ésta sale de la columna.

Los detectores pueden ser de dos tipos: ( 29 )

- Aquellos que miden únicamente alguna propiedad del soluto por ejemplo, la absorción al espectro ultravioleta o fluorescencia.
- Aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil, por ejemplo, el de índice de refracción.

#### DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION. ( 27 )

Este tipo de detector mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil.

Presenta las siguientes características:

- Cualquier soluto puede ser detectado.

- Tiene moderada sensibilidad, no se emplea para el análisis de trazas.
- Es sensible a los cambios de temperatura y de flujo.
- No se aconseja al usar gradiente de elución.
- No destruye la muestra.
- La señal generada puede ser positiva o negativa, según el índice de refracción de la solución que contiene la muestra sea mayor o menor que el índice de refracción del disolvente.

#### DETECTOR DE LUZ ULTRAVIOLETA. ( 27, 28 )

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

Presenta las siguientes características:

- Es insensible a los cambios de temperatura y de flujo.
- Se pueden obtener sensibilidades de hasta 0.005 unidades de absorción.
- Si el compuesto absorbe intensamente en el ultravioleta, es posible detectar cantidades de muestra del orden de nanogramos.
- Siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda de operación, se pueden efectuar programaciones de fase móvil.

Existen dos tipos de detectores de luz ultravioleta:

- a) De longitud de onda variable.
- b) De longitud de onda fija.

Con el detector de longitud de onda variable, se puede seleccionar la longitud de onda óptima para el compuesto, pueden evitarse problemas de la fase móvil como por ejemplo: absorción excesiva.

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

#### DETECTOR DE FLUORESCENCIA. ( 27, 28 )

La fluorescencia tiene lugar, cuando los compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos, se excitan con energía de ciertas longitudes de onda ( cortas ) y emiten radiaciones de mayores longitudes de onda.

Normalmente la emisión se determina en dirección perpendicular a la excitación y la capacidad real de fluorescencia de grupos químicos específicos, es función de las longitudes de onda de excitación y de emisión.

Este tipo de detectores presentan las siguientes características:

- Debido a su alta sensibilidad, se utiliza para el análisis de trazas.
- Son relativamente insensibles a los cambios de flujo y de presión.



- En la actualidad es el detector más sensible y específico.
- Cuando la muestra no tiene propiedades fluorescentes, es posible formar compuestos derivados de la muestra original que si poseen esta propiedad; esto es aplicable también a ciertos tipos de muestras que no poseen absorción en la región ultravioleta.

### 2.3.5 ANALISIS CUALITATIVO. ( 27 )

La cromatografía de líquidos es en esencia, una técnica de separación y no de identificación, y aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, siempre se requiere de alguna técnica no cromatográfica, para efectuar la identificación certera de un compuesto determinado, por ejem. resonancia magnética nuclear, espectrofotometría de masas, etc.

La forma de efectuar una identificación, es comparando los tiempos de retención de las sustancias por identificar, con los tiempos de retención de las sustancias de referencia, pero esto no basta para una identificación certera, debido a que el tiempo de retención puede ser característico de una sustancia en determinadas condiciones de operación, pero no es exclusivo, ya que dos o más sustancias pueden tener el mismo tiempo de retención, bajo las mismas condiciones.

### 2.3.6 ANALISIS CUANTITATIVO. ( 27 )

El análisis cuantitativo consiste en la determinación de la cantidad presente de los componentes de la muestra.

Después de la identificación de los componentes de la muestra, sigue el análisis cuantitativo, el cual consiste en establecer la cantidad o concentración de los componentes de la muestra.

El pico cromatográfico representa una gaussiana, que es una distribución de las moléculas que eluyen a lo largo del tiempo, el empleo de las áreas de los picos gaussianos ( cromatograma ), en el análisis cuantitativo, se basa en que la concentración de un componente de la muestra, es directamente proporcional a su área.

Entre los métodos de cuantificación se encuentran: ( 27 )

- 1) Estandarización Externa.
- 2) Estandarización Interna.

1) Estandarización Externa.

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

Las desventajas de este método son: ( 27, 28 )

- Es muy sensible a errores en la inyección de los estándares y de la muestra problema.
- Para poder comparar los resultados en la curva de calibración, la sensibilidad del detector debe mantenerse constante durante todo el análisis.

2) Estandarización Interna.

En este método se analizan por separado y en las mismas

condiciones, una solución de referencia formada por el estándar interno más el estándar del componente a determinar, y la solución de la muestra o la que se añade al estándar interno en la misma concentración que en la solución de referencia.

Las ventajas de este método son: ( 27, 28 )

- No requiere inyectar volúmenes de muestra con mucha precisión.
- Algunos errores se compensan, como por ejemplo: la recuperación de la muestra y variaciones instrumentales, por que tanto el compuesto problema como el estándar interno, se analizan a las mismas condiciones.

Los requisitos que debe cumplir un estándar interno son:

- Eluir cerca del compuesto de interés.
- Añadirlo en una concentración que produzca una respuesta parecida en tamaño o área, que la del compuesto de interés.
- No estar presente en la muestra original.
- Ser estable, no reaccionar con los compuestos de la muestra, con el empaque de la columna, ni con la fase móvil.
- Estar disponible comercialmente con alto grado de pureza.
- Dar un pico libre de interferencias.

## **CAPITULO 3**

# **VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

La validación de un proceso requiere de la calificación de cada uno de los elementos que, a juicio de la persona que lleve a cabo la validación son los más importantes, para demostrar que dicho proceso, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La Validación de un Método Analítico se define como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

El criterio para validar un método analítico depende de: las necesidades de cada Laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos oficiales pero, sobre todo, dependerá de la experiencia y del criterio farmacéutico de la persona que lleve a cabo la validación.

### 3.1 DEFINICIONES. ( 33 )

Los parámetros comunmente utilizados en la validación de métodos analíticos, son los siguientes:

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

**INTERVALO.** El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia ( incluyendo estos niveles ), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

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

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

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **REPETIBILIDAD.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones ( analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc. ).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

b) REPRODUCIBILIDAD. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferente equipos, etc. ).

LÍMITE DE DETECCIÓN. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

LÍMITE DE CUANTIFICACION. Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones de operación establecidas.

ESPECIFICIDAD. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

TOLERANCIA. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de

elución, tipos de empaque ( soporte, fase estacionaria, etc.)  
condiciones ambientales, etc.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.



## **CAPITULO 4**

### **PARTE EXPERIMENTAL**

#### 4.1 DESARROLLO DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR:

- A) Cafeína, Maleato de Feniramina y Benzocaína.
- B) Clorhidrato de Piridoxina, Cafeína y Benzocaína.

##### 4.1.1 EQUIPO Y MATERIAL

El equipo, materiales y reactivos que a continuación se describen, fueron utilizados para los métodos A y B.

- Cromatógrafo de Líquidos Waters equipado con:
  - a) Bomba modelo 600-E
  - b) Inyector automático modelo Wisp 700 Satellite
  - c) Horno de calentamiento para columnas Waters
  - d) Detector de absorbancia U.V. de longitud de onda variable modelo 484
  - e) Computadora NEC modelo Power Mate 1
  - f) Paquete de cómputo Waters Máxima 825
  
- Sistema de microfiltración para disolventes:
  - a) Membrana Millipore tipo FHUP 047000 de 0.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para filtrar disolventes orgánicos.
  - b) Membrana Millipore tipo HAWP 047000 de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para filtrar disolventes acuosos.
  
- Milli-Q Waters System, Millipore.
- Papel filtro Whatman no.1
- Molino pulverizador Janke & Kunkel.
- Baño de ultrasonido.
- Matraces volumétricos.
- Pipetas volumétricas.

#### 4.2.2 REACTIVOS

- Agua destilada, grado CLAR.
- Acetonitrilo grado CLAR Baker.
- Acetonitrilo R. A. Tecsiquim.
- Sal sódica del ácido 1-pentansulfónico ( PIC B5 ).
- Acido fosfórico, R. A. Merck.
- Benzocaina, sustancia de referencia o estándar de trabajo.
- Cafeína, sustancia de referencia o estándar de trabajo.
- Maleato de Fenframina, sustancia de referencia o estándar de trabajo.
- Nipagin materia prima ( estándar interno ).
- Clorhidrato de Piridoxina, sustancia de referencia o estándar de trabajo.

4.1.3 DETERMINACION DE CAFEINA, MALEATO DE FENIRAMINA Y  
BENZOCAINA POR CLAR.

4.1.3.1 PARAMETROS INSTRUMENTALES

Condiciones

Fase móvil: 82 por ciento de una solución preparada disolviendo 0.4 g de la sal sódica del ácido 1-pentansulfónico en 82 ml de ácido fosfórico diluido ( 1:1000 ), más 18 por ciento de acetonitrilo grado CLAR, filtrada y degasificada.

Velocidad de flujo: 2 ml/min.

Columna: De acero inoxidable de 25 cm ( long. ) por 4.6 mm ( d.i. ) empacada con partículas esféricas de sílica de 5 micras de diámetro, recubiertas con octadecilsilano ( Ultrasphere ODS, Beckman ).

Detector: U. V. a 262 nm, 0.10 UA.

Temperatura de la columna: 40 °C.  $\pm$  1 °C.

Volumen de inyección: 10  $\mu$ l

Tiempo de corrida: 15 minutos

### Tiempos de retención

Cafeína	aprox. 2.1 min.
Maleato de Feniramina	aprox. 5.2 min.
Nipagin ( estándar interno )	aprox. 8.2 min.
Benzocaína	aprox. 11.5 min.

Ver el cromatograma en la pág. no 107

Nota: Las condiciones cromatográficas descritas se aproximan a los parámetros óptimos. Sin embargo, en base al equilibrio del sistema, a las variaciones en la columna, la elución de los componentes y los tiempos de retención pueden variar.

#### 4.1.3.2 PREPARACION DE SOLUCIONES

##### Solución de Referencia

Pesar con exactitud las siguientes sustancias de referencia o estándares de trabajo: 20 mg de Cafeína, 30 mg de Maleato de Feniramina y 50 mg de Benzocaína, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml, adicionar aproximadamente 30 ml de FMm\* y llevar al baño de ultrasonido durante 5 min. Llevar al volumen con FMm\*: tomar 5 ml de esta solución, transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml, llevar al volumen con FMm\* y mezclar bien.

Nota: FMm\* es una solución preparada con agua destilada/acetónitrilo R. A. en una proporción de 1:5:35, ajustada a pH 2.6 con Acido Fosfórico R. A.

### Solución de Estándar Interno

Pesar con exactitud alrededor de 25 mg de Nipagin materia prima, transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y llevar al volumen con FMm\*, mezclar bien. Tomar 1 ml de esta solución, transferirlo a un matraz volumétrico de 25 ml llevar al volumen con FM\* y mezclar bien.

### Solución Factor Respuesta

Por duplicado, tomar con pipeta volumétrica 1 ml de la solución de referencia, transferir a matraces volumétricos de 25 ml, adicionar 1 ml de la solución de estándar interno y llevar al volumen con FMm\*, mezclar bien.

Concentración teórica de la solución Factor Respuesta:

( Soluciones FR1 y FR2 ).

Cafeína	± 0.0032 mg/ml
Maleato de Feniramina	± 0.0048 mg/ml
Estándar Interno	± 0.0016 mg/ml
Benzocaína	± 0.0080 mg/ml

### Solución Problema

Pesar el contenido de 35 cápsulas\*, obtener el peso promedio, pulverizar en el molino y mezclar el polvo; por duplicado, pesar con exactitud alrededor de 420 mg de polvo, y transferir a matraces volumétricos de 100 ml, adicionar aproximadamente 50 ml de FMm\*, y llevar las muestras al baño de ultrasonido por 10 minutos. Llevar al volumen con FMm\* y mezclar

bien. Filtrar las soluciones a través de papel filtro Whatman no. 1. Tomar con pipeta volumétrica 10 ml de cada solución filtrada y transferir a matraces volumétricos de 50 ml\*\*, llevar al volumen con FMm\* y mezclar bien. Tomar 2 ml de estas soluciones y transferirlos a matraces volumétricos de 25 ml. Adicionar 1 ml de solución de estándar interno a cada matraz. Llevar al volumen con FMm\* y mezclar bien.

Soluciones S1 y S2.

* Cada cápsula contiene:	Benzocaína	50 mg
	Cafeína	20 mg
	Maleato de Feniramina	30 mg
	Clorhidrato de Piridoxina	5 mg
	Excipiente c.b.p.	408 mg

\*\* Guardar esta solución para el análisis de Clorhidrato de Piridoxina. Ver 4.1.4.2 pág. 111

Concentración teórica de la Solución Problema:

( soluciones S1 y S2 )

Cafeína	± 0.0033 mg/ml
Maleato de Feniramina	± 0.0049 mg/ml
Estándar Interno	± 0.0016 mg/ml
Benzocaína	± 0.0082 mg/ml

#### 4.1.3.3 ANALISIS

Equilibrar el Cromatógrafo de Líquidos a las condiciones de operación establecidas, hasta tener una línea base estable.

Inyectar por duplicado 10 mc1 de las soluciones FR1, FR2, S1, y S2.

Una vez terminado el análisis, lavar la bomba y la columna primero con 60 ml de agua destilada grado CLAR, después con 50 ml de una solución al 40 por ciento de acetonitrilo grado CLAR y 60 por ciento de agua destilada grado CLAR.

#### 4.1.3.4 CALCULOS

Medir con exactitud la respuesta ( área o altura de los picos ) de las soluciones Factor Respuesta y Problema.

##### a) Factor Respuesta ( FR )

$$FR = \frac{A r}{A s i} \times \frac{P s i}{P r} \times 0.4$$

Donde:

A r = Area o altura del pico de Cafeína, Maleato de Feniramina y Benzocaína respectivamente, en la solución factor respuesta.

A s i = Area o altura del pico de Nipagin en la solución factor respuesta.

P s i = Peso de Nipagin, materia prima ( estándar interno )

P r = Peso de Cafeína, Maleato de Feniramina o Benzocaína, sustancias de referencia o estándares de trabajo.

0.4 = Factor de dilución

b) Calcular la cantidad de Cafeína, Maleato de Feniramina y Benzocaína por cápsula con la fórmula siguiente:



$$\text{mg activo/ cápsula} = \frac{A m}{A s i} \times \frac{P s i}{P m} \times \frac{PP}{FR} \times 0.4$$

Donde:

A m = Area o altura del pico de Cafeína, Maleato de Feniramina y Benzocaína respectivamente, en la solución problema.

A s i = Area o altura del pico de Nipagin en la solución problema.

P s i = Peso de Nipagin, materia prima.

P m = Peso de la muestra, mg.

PP = Peso promedio de las cápsulas.

FR = Factor respuesta para Cafeína, Maleato de Feniramina y Benzocaína respectivamente.

0.4 = Factor de dilución.

c) Calcular el porcentaje de Cafeína, Maleato de Feniramina y Benzocaína, con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Cafeína} = \frac{\text{mg Cafeína / cápsula}}{\text{mg teóricos de Cafeína / cápsula}} \times 100$$

$$\% \text{ Maleato de Feniramina} = \frac{\text{mg Maleato de Feniramina / cápsula}}{\text{mg teóricos de Mto de Feniramina/ cáp.}} \times 100$$

$$\% \text{ Benzocaína} = \frac{\text{mg Benzocaína / cápsula}}{\text{mg teóricos de Benzocaína / cápsula}} \times 100$$

Linealidad del sistema

Este parámetro se determina, construyendo una curva de calibración ( concentración vs respuesta medida ), utilizando cuando menos 5 diluciones, preparadas a partir de una misma solución patrón, y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

En las Tablas I, II y III se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

$CV \leq 1.5 \%$  ,  $r \geq 0.99$  ,  $r^2 \geq 0.98$

Precisión del sistema

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

En las Tablas IV, V y VI se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

$CV \leq 1.5 \%$

Linealidad del método

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, ( placebos cargados ), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Los resultados obtenidos y su análisis estadístico, se muestran en las Tablas VII, VIII y IX.

Criterio:

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:  $m \approx 1$ ,  $b \approx 0$ ,

$$r^2 \geq 0.98$$

Promedio de Recobro: 98-102 %

Coefficiente de Variación (CV)  $\leq 2$  %

#### Exactitud y repetibilidad al 100 %

Se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

En las Tablas X, XI y XII se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

Promedio de Recobro: 98-102 %

Coefficiente de Variación (CV)  $\leq 2$  %

#### PRECISION ( Reproducibilidad )

Se determina de una muestra homogénea del producto, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

En las Tablas XIII, XIV y XV se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

El CV total debe ser  $\leq 2\%$

Especificidad para métodos de control de calidad

Con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar la(s) respuesta(s) del(los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

En las figuras número 1 y 2 página 107, se encuentran los resultados obtenidos.

Criterio:

Confirmar que la Metodología Analítica desarrollada es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

Estabilidad de la muestra analítica

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras, con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

En las Tablas XVI y XVII se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

La muestra es estable, si el IC para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o el valor de la media para el factor I se encuentra entre 98 - 102 %.

#### 4.1.3.6 RESULTADOS

Tabla no. 1

Linealidad del Sistema para el Método por CLAR para Cafeína

Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (milivolts)
0.1350	14738
0.2025	22151
0.2700	28990
0.3376	36807
0.4051	44316
0.4726	51813
0.5401	58977

Coefficiente de Variación (CV) = 0.69 %

Coefficiente de Correlación (r) = 0.99992

Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>) = 0.99983

Ya que  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$  y  $CV \leq 1.5$  %

se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

Tabla no. II

Linealidad del Sistema para el Método por CLAR para Maleato de Feniramina

Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (milivolts)
0.1958	8118
0.2937	12288
0.3916	16247
0.4896	20387
0.5875	24669
0.6854	28406
0.7833	32394

Coefficiente de Variación (CV) = 0.56 %

Coefficiente de Correlación (r) = 0.99990

Coefficiente de Determinación ( $r^2$ ) = 0.99979

Ya que  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$ , y  $CV \leq 1.5$  %

Se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

Tabla no. III

Linealidad del Sistema para el Método por CLAR para  
Benzocafina

Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (millivolts)
0.3296	36152
0.4944	52230
0.6592	70280
0.8240	87878
0.9888	104827
1.1536	122873
1.3184	140640

Coefficiente de Variación (CV) = 1.23 %

Coefficiente de Correlación (r) = 0.99992

Coefficiente de Determinación ( $r^2$ ) = 0.99984

Ya que  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$  y  $CV \leq 1.5$  %

Se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

Tabla no. IV

Precisión del Sistema para el Método por CLAR para Cafeína

No. de inyección	Factor Respuesta
1	0.4357
2	0.4336
3	0.4377
4	0.4390
5	0.4372
6	0.4382

Media = 0.4369

Desviación Estándar (DE) = 0.0020

Coefficiente de Variación (CV) = 0.45 %

Ya que  $CV \leq 1.5 \%$

Se cumple con el criterio para la precisión del sistema.



Tabla no. V

Precisión del Sistema para el Método por CLAR para Maleato de Fenramina

No. de inyección	Factor Respuesta
1	0.1571
2	0.1572
3	0.1570
4	0.1554
5	0.1568
6	0.1544

Media = 0.1563

Desviación estándar (DE) = 0.0011

Coefficiente de variación (CV) = 0.74 %

Ya que  $CV \leq 1.5 \%$

se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

Tabla VI

Precisión del Sistema para el Metodo por CLAR para Benzocaína

No. de inyección	Factor Respuesta
1	0.3830
2	0.3826
3	0.3749
4	0.3828
5	0.3869
6	0.3833

Media = 0.3822

Desviación estándar (DE) = 0.0039

Coefficiente de Variación (CV) = 1.03 %

Ya que  $CV \leq 1.5 \%$

se cumple con el criterio para la precisión del sistema

Tabla VII

Linealidad del Método por CLAR para Cafeína.

Tabla de cantidad adicionada vs cantidad recuperada

cantidad adicionada ( mg/ cáp )	cantidad recuperada ( mg/ cáp )		
X = 15 1	Y = 14.82 11	Y = 14.94 12	Y = 15.13 13
X = 20 2	Y = 20.06 21	Y = 19.88 22	Y = 19.93 23
X = 25 3	Y = 24.92 31	Y = 25.06 32	Y = 24.88 33

Nota: X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> = 15; X<sub>21</sub>, X<sub>22</sub>, X<sub>23</sub> = 20; X<sub>31</sub>, X<sub>32</sub>, X<sub>33</sub> = 25

X<sub>2</sub> corresponde al 100 %

Pendiente (m) = 0.9990

Intercepto (b) = -0.0222

Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>) = 0.9994

Coefficiente de Correlación (r) = 0.9997

Promedio del por ciento recuperado = 99.78

Desviación Estándar (DE) = 0.6022

Coefficiente de Variación (CV) = 0.60 %

Ya que  $b \approx 0$ ,  $m \approx 1$ ,  $r^2 \geq 0.98$ , el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq 2\%$ ; se cumple con los criterios para linealidad del método.

Tabla VIII

Linealidad del Método por CLAR para Maleato de Feniramina

Tabla de cantidad adicionada vs cantidad recuperada

cantidad adicionada ( mg/ cáp )	cantidad recuperada ( mg/ cáp )		
X = 22.5 1	Y = 22.38 11	Y = 22.64 12	Y = 22.4 13
X = 30.0 2	Y = 30.06 21	Y = 30.32 22	Y = 29.89 23
X = 37.5 3	Y = 37.68 31	Y = 37.32 32	Y = 37.48 33

Nota:  $X_{11}, X_{12}, X_{13} = 22.5$ ;  $X_{21}, X_{22}, X_{23} = 30.0$ ;

$X_{31}, X_{32}, X_{33} = 37.5$

X corresponde al 100 %  
2

Pendiente (m)	=	1.0013
Intercepto (b)	=	-0.0311
Coefficiente de Determinación ( $r^2$ )	=	0.9994
Coefficiente de Correlación (r)	=	0.9997
Promedio del por ciento recuperado	=	100.02
Desviación Estándar (DE)	=	0.5119
Coefficiente de Variación (CV)	=	0.51 %

Ya que  $b \approx 0$ ,  $m \approx 1$ ,  $r^2 \geq 0.98$ , el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el  $CV \leq 2$  %; se cumple con los criterios para linealidad del método.

Tabla IX

Linealidad del Método por CLAR para Benzocaína

Tabla de cantidad adicionada vs cantidad recuperada

cantidad adicionada ( mg/ cáp )	cantidad recuperada ( mg/ cáp )		
X = 37.5 1	Y = 37.56 11	Y = 37.42 12	Y = 37.30 13
X = 50.0 2	Y = 50.06 21	Y = 49.93 22	Y = 50.30 23
X = 62.5 3	Y = 62.56 31	Y = 62.49 32	Y = 62.61 33

Nota: X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> = 37.5; X<sub>21</sub>, X<sub>22</sub>, X<sub>23</sub> = 50.0

X<sub>31</sub>, X<sub>32</sub>, X<sub>33</sub> = 62.5

X<sub>2</sub> corresponde al 100 %

Pendiente (m)	=	1.0051
Intercepto (b)	=	-0.2294
Coefficiente de Determinación (r <sup>2</sup> )	=	0.9998
Coefficiente de Correlación (r)	=	0.9999
Promedio del por ciento recuperado	=	100.03
Desviación Estándar (DE)	=	0.3133
Coefficiente de Variación (CV)	=	0.31 %

Ya que  $b \approx 0$ ,  $m \approx 1$ ,  $r^2 \geq 0.98$ , el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq 2$  %; se cumple con los criterios para linealidad del método.

Tabla X

Exactitud y Repetibilidad al 100 % para Cafeína

Muestra	100 % de la cantidad etiquetada ( 20 mg/ cápsula )	% recobro
1	20.06	100.30
2	19.88	99.40
3	19.93	99.65
4	20.01	100.05
5	19.93	99.65
6	20.08	100.40

Promedio del por ciento recuperado = 100.19

Desviación Estándar (DE) = 0.6488

Coefficiente de Variación (CV) = 0.65 %

Ya que el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq$  2 %; cumple con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla XI

Exactitud y Repetibilidad al 100 % para Maleato de Feniramina

Muestra	100 % de la cantidad etiquetada ( 30 mg/ cápsula )	% recobro
1	30.06	100.20
2	30.23	100.77
3	29.89	99.63
4	29.79	99.30
5	30.30	101.00
6	30.08	100.27

Promedio del por ciento recuperado = 100.19

Desviación Estándar (DE) = 0.6488

Coefficiente de Variación (CV) = 0.65 %

Ya que el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq$  2 %; cumple con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla XII

Exactitud y Repetibilidad al 100 % para Benzocaína

muestra	100 % de la cantidad etiquetada ( 50 mg/ cápsula )	% recobro
1	50.06	100.12
2	49.93	99.86
3	50.30	100.60
4	49.99	99.98
5	50.32	100.64
6	50.30	100.60

Promedio del por ciento recuperado = 100.30

Desviación Estándar (DE) = 0.3532

Coefficiente de Variación (CV) = 0.35 %

Ya que el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq$  2 %; cumple con los criterios de aceptación establecidos.



Tabla XIII

Precisión ( Reproducibilidad ) para Cafeína

Datos de reproducibilidad en ( % )

		ANALISTA	
		UNO	DOS
D	U	100.08	100.41
	N	101.74	99.35
	O	100.31	98.87
I	D	100.05	101.45
	O	99.65	100.00
	S	99.57	100.46

Tabla de Análisis de Varianza ( ANADEV A )

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F 0.05*
Analista	1	0.050	0.050	Fa 0.0327	Fgla/gld 38.51
Día	2	3.053	1.527	Fd 3.0848	Fgld/gle 6.06
Error	8	3.957	0.495	-----	-----

Interpretación:

Ya que  $F_a < F_{gla/gld}; 0.05$  La Metodología Analítica es reproducible por los analistas.

Ya que  $F_d < F_{gld/gle}; 0.05$  La Metodología Analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Repetibilidad del Método Analítico = 0.7036

Media Aritmética Total = 100.17

Desviación Estándar Total = 0.8007

Coefficiente de Variación Total = 0.80 %

Tabla XIV

Precisión ( Reproducibilidad ) para Maleato de Feniramina  
 Datos de reproducibilidad en ( % )

		ANALISTA	
		UNO	DOS
D	U	96.58	98.53
	N	98.06	96.37
	O	97.01	96.21
I	D	97.59	97.90
	O	97.63	97.13
	S	97.95	97.23

Tabla de Análisis de Varianza ( ANADEV A )

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fca1	F0.05*
Analista	1	0.1670	0.1670	Fa 0.5535	Fgla/gld 38.51
Día	2	0.6033	0.3017	Fd 0.4886	Fgld/gle 6.06
Error	8	4.94	0.6175	-----	-----

Interpretación:

Ya que  $F_a < F_{gla/gld}$ ; 0.05 La Metodología Analítica es reproducible por los analistas.

Ya que  $F_d < F_{gld/gle}$ ; 0.05 La Metodología Analítica es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Repetibilidad del Método Analítico = 0.7858

Media Aritmética Total = 97.35

Desviación Estándar Total = 0.7205

Coefficiente de Variación Total = 0.74 %

Tabla XV

Precisión ( Reproducibilidad ) para Benzocafina

Datos de reproducibilidad en ( % )

		ANALISTA	
		UNO	DOS
D	U	91.46	91.20
	N	90.33	91.10
	O	90.14	89.31
I	D	90.22	89.44
	O	90.46	89.62
	S	90.11	90.22

Tabla de Análisis de Varianza ( ANADEV A )

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fca1	FO.05*
Analista	1	0.2790	0.2790	Fa 0.4989	Fgla/gld 38.51
Día	2	1.1183	0.5592	Fd 1.2154	Fgld/gle 6.06
Error	8	3.6807	0.4601	-----	-----

**Interpretación:**

Ya que  $F_a < F_{gla/gld}$ ; 0.05 La Metodología Analítico es reproducible por los analistas.

Ya que  $F_d < F_{gld/gle}$ ; 0.05 La Metodología Analítica es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Repetibilidad del Método Analítico = 0.6783

Media Aritmética Total = 90.30

Desviación Estándar Total = 0.6792

Coefficiente de Variación Total = 0.75 %

### Especificidad de la Muestra

Fig. 1 Cromatograma de la respuesta de los Activos.

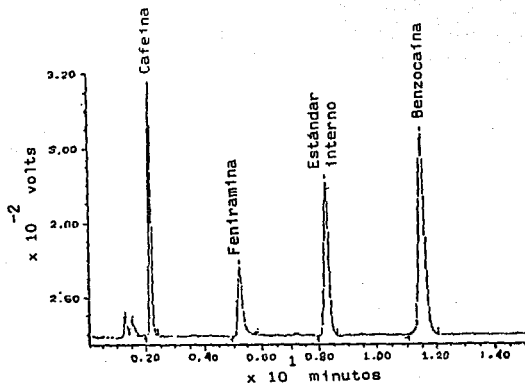
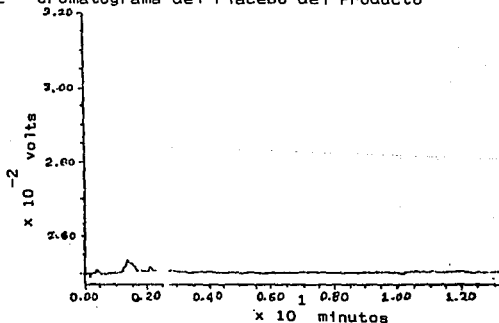


Fig. 2 Cromatograma del Placebo del Producto



Resultado: El método desarrollado es capaz de cuantificar los Activos de interés, sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

### Estabilidad de la Muestra Analítica

Las condiciones a las que se sometió la solución para el estudio de estabilidad, fueron las siguientes:

- a) Temperatura ambiente durante 24 horas.
- b) Temperatura ambiente durante 72 horas.
- c) Refrigeración durante 24 horas.

Se utilizó una solución de referencia recientemente preparada a cada tiempo de reanálisis, las determinaciones las efectuó un mismo analista.

#### Datos de estabilidad ( % )

Activo	Condición / Tiempo			
	Inicial	T. A. / 24 hrs	T. A. / 72 hrs	Ref/ 24 hrs
Cafeína	100.16	99.75	99.35	99.97
	99.97	98.97	98.86	100.02
	100.42	99.47	99.15	99.85
Mto. de Feniramina	97.56	96.93	96.53	96.26
	97.10	96.05	96.20	95.85
	97.86	96.58	97.11	96.38
Benzocaína	91.18	89.04	87.16	89.42
	89.38	90.28	87.21	90.49
	90.20	89.09	88.26	89.74

#### Resultados

Tabla XVI

#### Intervalo de Confianza

Activo	T. A. / 24 hrs	T. A. / 72 hrs	Ref/ 24 hrs
Cafeína	-0.172 a -1.400	-0.613 a -1.513	-0.562 a 0.089
Mto. de Feniramina	-1.776 a -0.197	-1.701 a -0.085	-1.981 a -0.70
Benzocaína	-2.323 a 0.756	-4.186 a -1.234	-1.792 a 1.052

Tabla XVII

## Factor I

Activo	T. A./ 24 hrs	T. A./ 72 hrs	Ref/ 24 hrs
Cafeína	99.21 %	98.98 %	99.76 %
Mto. de Feniramina	98.99 %	99.08 %	98.62 %
Benzocaína	99.14 %	97.00 %	99.60 %

Conclusión: La muestra es estable por 24 horas a condiciones ambientales y en refrigeración, pero NO es estable a condiciones ambientales por 72 horas.

#### 4.1.4 DETERMINACIÓN DE CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA, CAFEINA Y BENZOCAINA

##### 4.1.4.1 PARAMETROS INSTRUMENTALES

###### Condiciones

Fase móvil: 87 por ciento de una solución preparada disolviendo 0.4 g de la sal sódica del ácido 1-pentansulfónico en 82 ml de ácido fosfórico diluido ( 1:1000 ), más 13 por ciento de acetonitrilo grado CLAR filtrada y degasificada.

Velocidad de flujo: 2 ml/ min.

Columna: De acero inoxidable de 25 cm ( long. ) por 4.6 mm ( d. i. ) empacada con partículas esféricas de sílica de 5 micras de diámetro, recubiertas con octadecilsilano ( Ultrasphere ODS, Beckman ).

Detector: U. V. a 290 nm, o.10 UA.

Temperatura de la columna: 40° C. ± 1 °C.

Volumen de inyección: 10 mc1.

Tiempo de corrida: 25 min.

### Tiempos de retención

Clorhidrato de Piridoxina	aprox. 2.0 min.
Cafeína	aprox. 3.0 min.
Benzocaína	aprox. 20.2 min.

Ver el cromatograma en la pág. 131

Nota: Las condiciones cromatográficas descritas se aproximan a los parámetros óptimos. Sin embargo, en base al equilibrio del sistema, a las variaciones en la columna; la elución de los componentes y los tiempos de retención pueden variar.

#### 4.1.4.2 PREPARACION DE SOLUCIONES

##### Solución de Referencia

Pesar con exactitud las siguientes sustancias de referencia o estándares de trabajo: 12.5 mg de Clorhidrato de Piridoxina, 50 mg de Cafeína y 125 mg de Benzocaína, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar aproximadamente 50 ml de FMm\* y llevar al baño de ultrasonido durante 5 min. Llevar al volumen con FMm\*; tomar 5 ml de esta solución, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml, llevar al volumen con FMm\* y mezclar bien. Por duplicado, tomar 4 ml de esta solución, transferirlos a matraces volumétricos de 25 ml, llevar al volumen con FMm\* y mezclar bien.



Concentración final de la Solución de Referencia:

( Soluciones R1 y R2 )

Clorhidrato de Piridoxina  $\pm$  0.0020 mg/ ml

Cafeína  $\pm$  0.0080 mg/ ml

Benzocaína  $\pm$  0.0200 mg/ ml

Solución Problema

Partiendo de la solución marcada como \*\* de la solución problema del paso 4.1.3.2 ( ver pág 86 ); por duplicado, tomar con pipeta volumétrica 5 ml, transferirlos a matraces volumétricos de 25 ml, llevar al volumen con FMm\* y mezclar bien.

Concentración teórica de la Solución Problema:

( Soluciones P1 y P2 )

Clorhidrato de Piridoxina  $\pm$  0.0020 mg/ ml

Cafeína  $\pm$  0.0082 mg/ ml

Benzocaína  $\pm$  0.0205 mg/ ml

Nota: FMm\* es una solución preparada con agua destilada/ acetónitrilo R. A. en una proporción de 65:35, ajustada a pH 2.6 con Acido Fosfórico R. A.

#### 4.1.4.3 ANALISIS

Equilibrar el Cromatógrafo de Líquidos a las condiciones de operación establecidas, hasta tener una línea base estable.

Inyectar por duplicado 10 mc1 de las soluciones R1, R2, P1 y P2.

Una vez terminado el análisis, lavar la bomba y la columna primero con 60 ml de agua destilada grado CLAR, después con 50 ml de una solución al 40 por ciento de acetonitrilo grado CLAR y 60 por ciento de agua destilada grado CLAR.

#### 4.1.4.4 CALCULOS

Medir con exactitud la respuesta ( área o altura de los picos ) de las soluciones de Referencia y Problema.

a) Calcular la cantidad de Clorhidrato de Piridoxina, Cafeína y Benzocaína con la fórmula siguiente:

$$\text{mg activo/ cápsula} = \frac{A m}{A st} \times \frac{P st}{P m} \times PP \times 0.4$$

Donde:

A m = Area o altura del pico de Clorhidrato de Piridoxina, Cafeína y Benzocaína, respectivamente en la solución problema.

A st = Area o altura del pico de Clorhidrato de Piridoxina, Cafeína y Benzocaína, respectivamente en la solución de referencia.

P st = Peso de Clorhidrato de Piridoxina, Cafeína o Benzocaína, sustancias de referencia o estándares de trabajo.

P m = Peso de la muestra, mg.

PP = Peso promedio de las cápsulas.

0.4 = Factor de dilución.

- b) Calcular el porcentaje de Clorhidrato de Piridoxina, Cafeína y Benzocaína con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Piridoxina HCl} = \frac{\text{mg Clorhidrato de Piridoxina/cápsula}}{\text{mg teóricos de Clorhidrato de Piridoxina/ cáp.}} \times 100$$

$$\% \text{ Cafeína} = \frac{\text{mg Cafeína/ cápsula}}{\text{mg teóricos de Cafeína/ cápsula}} \times 100$$

$$\% \text{ Benzocaína} = \frac{\text{mg Benzocaína/ cápsula}}{\text{mg teóricos de Benzocaína/ cápsula}} \times 100$$

#### 4.1.4.5 VALIDACION DEL METODO

Los parámetros evaluados se determinaron de la misma forma que en la sección 4.1.3.5

A continuación se indican las Tablas donde se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico, para cada parámetro.

<u>Parámetro</u>	<u>Tabla</u>
Linealidad del Sistema	XVIII, XIX, XX
Precisión del Sistema	XXI, XXII, XXIII
Linealidad del Método	XXIV, XXV, XXVI

<u>Parámetro</u>	<u>Tabla</u>
Exactitud y Repetibilidad al 100 %	XXVII, XXVIII, XXIX
Precisión ( Reproducibilidad )	XXX, XXXI, XXXII
Estabilidad	XXXIII, XXXIV
Especificidad	Ver figuras número 3 y 4 en la página 131

#### 4.1.4.6 RESULTADOS

Tabla no. XVIII

Linealidad del Sistema para el Método por CLAR para  
Clorhidrato de Piridoxina

Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (milivolts)
0.0514	5329
0.1028	10830
0.1542	16126
0.2056	21910
0.2570	27104
0.3084	32224
0.3598	38126

Coefficiente de variación (CV) = 0.93 %

Coefficiente de correlación (r) = 0.99988

Coefficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.99976

Ya que  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$  y  $CV \leq 1.5$  %

se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

Tabla no. XIX

Linealidad del Sistema para el Método por CLAR para Cafeína

Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (millivolts)
0.2004	9816
0.4008	19939
0.6012	29540
0.8016	39995
1.0020	50621
1.2024	59202
1.4028	70903

Coefficiente de Variación (CV)	=	1.29 %
Coefficiente de Correlación (r)	=	0.99969
Coefficiente de Determinación (r <sup>2</sup> )	=	0.99938

Ya que  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$  y  $CV \leq 1.5 \%$

se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

Tabla no. XX

Linealidad del Sistema para el Método por CLAR para Benzocaína.

Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (millivolts)
0.5052	77726
1.0104	155561
1.5156	233210
2.0208	313146
2.5260	393194
3.0312	465741
3.5364	550076

Coefficiente de Variación (CV) = 0.56 %  
Coefficiente de Correlación (r) = 0.99993  
Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>) = 0.99986

Ya que  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$  y  $CV \leq 1.5 \%$   
se cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

Tabla no. XXI

Precisión del Sistema para el Método por CLAR para  
Clorhidrato de Piridoxina

No. de inyección	Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (millivolts)
1	0.2056	21977
2	0.2056	21665
3	0.2056	21910
4	0.2056	21976
5	0.2056	21945
6	0.2056	21921

Media = 21899

Desviación Estándar (DE) = 117.88

Coefficiente de Variación (CV) = 0.54 %

Ya que  $CV \leq 1.5 \%$

se cumple con el criterio para la precisión del sistema.



Tabla no. XXII

Precisión del Sistema para el Método por CLAR para Cafeína

No. de inyección	Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (millivolts)
1	0.8016	39958
2	0.8016	39854
3	0.8016	39503
4	0.8016	40149
5	0.8016	39995
6	0.8016	40343

Media = 39967

Desviación Estándar (DE) = 284.05

Coefficiente de Variación (CV) = 0.71 %

Ya que CV  $\leq$  1.5 %

se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

Tabla no. XXIII

Precisión del Sistema para el Método por CLAR para Benzocaína

no. de inyección	Concentración en mg/ 100 ml a partir de la solución patrón	Respuesta Medida (milivolts)
1	2.0208	316161
2	2.0208	314625
3	2.0208	317014
4	2.0208	317086
5	2.0208	316501
6	2.0208	313146

Media = 315755.5

Desviación Estándar (DE) = 1559.6

Coefficiente de Variación (CV) = 0.49 %

Ya que CV  $\leq$  1.5 %

se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

Tabla no. XXIV

Linealidad del Método por CLAR para Clorhidrato de Piridoxina

Tabla de cantidad adicionada vs cantidad recuperada

cantidad adicionada ( mg/ cáp )	cantidad recuperada ( mg/ cáp )		
X = 3.75 1	Y = 3.77 11	Y = 3.72 12	Y = 3.79 13
X = 5.00 2	Y = 4.97 21	Y = 5.04 22	Y = 4.95 23
X = 6.25 3	Y = 6.22 31	Y = 6.32 32	Y = 6.27 33

Nota: X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> = 3.75; X<sub>21</sub>, X<sub>22</sub>, X<sub>23</sub> = 5.00

X<sub>31</sub>, X<sub>32</sub>, X<sub>33</sub> = 6.25

X<sub>2</sub> corresponde al 100 %

Pendiente (m)	=	1.0040
Intercepto (b)	=	-0.01444
Coefficiente de Determinación (r <sup>2</sup> )	=	0.99856
Coefficiente de Correlación (r)	=	0.99928
Promedio del por ciento recuperado	=	100.17
Desviación Estándar (DE)	=	0.8330
Coefficiente de Variación (CV)	=	0.83 %

Ya que  $b \approx 0$ ,  $m \approx 1$ ,  $r^2 \geq 0.98$ , el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq 2$  %; se cumple con los criterios para linealidad del método.

Tabla XXV

Linealidad del Método por CLAR para Cafeína

Tabla de cantidad adicionada vs cantidad recuperada

cantidad adicionada ( mg/ cáp )	cantidad recuperada ( mg/ cáp )		
X = 15 1	Y = 15.12 11	Y = 14.93 12	Y = 15.06 13
X = 20 2	Y = 20.14 21	Y = 20.12 22	Y = 19.91 23
X = 25 3	Y = 25.03 31	Y = 25.25 32	Y = 24.96 33

Nota:  $X_{11}, X_{12}, X_{13} = 15$ ;  $X_{21}, X_{22}, X_{23} = 20$

$X_{31}, X_{32}, X_{33} = 25$

$X_2$  corresponde al 100 %

Pendiente (m)	=	1.0043
Intercepto (b)	=	-0.02888
Coefficiente de Determinación ( $r^2$ )	=	0.99936
Coefficiente de Correlación (r)	=	0.99968
Promedio del por ciento recuperado	=	100.28
Desviación Estándar (DE)	=	0.5473
Coefficiente de Variación (CV)	=	0.55 %

Ya que  $b \approx 0$ ,  $m \approx 1$ ,  $r^2 \geq 0.98$ , el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq 2$  %; se cumple con los criterios para linealidad del método.

Tabla XXVI

Linealidad del Método para Benzocaína

Tabla de cantidad adicionada vs cantidad recuperada

cantidad adicionada ( mg/ cáp )	cantidad recuperada ( mg/ cáp )		
X = 37.5 1	Y = 37.69 11	Y = 37.45 12	Y = 37.88 13
X = 50.0 2	Y = 49.53 21	Y = 50.28 22	Y = 49.85 23
X = 62.5 3	Y = 62.72 31	Y = 62.94 32	Y = 62.39 33

Nota:  $X_{11}, X_{12}, X_{13} = 37.5$ ;  $X_{21}, X_{22}, X_{23} = 50.0$

$X_{31}, X_{32}, X_{33} = 62.5$

X<sub>2</sub> corresponde al 100 %

Pendiente (m)	=	1.00041
Intercepto (b)	=	0.06111
Coefficiente de Determinación (r <sup>2</sup> )	=	0.99926
Coefficiente de Correlación (r)	=	0.99963
Promedio del por ciento recuperado	=	100.18
Desviación Estándar (DE)	=	0.6074
Coefficiente de Variación (CV)	=	0.61 %

Ya que  $b \approx 0$ ,  $m \approx 1$ ,  $r^2 \geq 0.98$ , el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq 2$  %; se cumple con los criterios para la linealidad del método.

Tabla XXVII

Exactitud y Repetibilidad al 100 % para Clorhidrato de Piridoxina

Muestra	100 % de la cantidad etiquetada ( 5 mg/ cápsula )	% recobro
1	4.9760	99.52
2	4.9740	99.48
3	5.0470	100.94
4	4.9785	99.57
5	4.9525	99.05
6	2.9595	99.19

Promedio del por ciento recuperado = 99.63

Desviación Estándar (DE) = 0.6759

Coefficiente de Variación (CV) = 0.68 %

Ya que, el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq$  2 %; cumple con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla XXVIII

Exactitud y Repetibilidad al 100 % para Cafeína

Muestra	100 % de la cantidad etiquetada ( 20 mg/ cápsula )	% recobro
1	20.1760	100.88
2	20.1280	100.64
3	20.1400	100.70
4	19.8160	99.08
5	19.8640	99.32
6	19.9120	99.56

Promedio del por ciento recuperado = 100.03

Desviación Estándar (DE) = 0.79

Coefficiente de Variación (CV) = 0.80 %

Ya que, el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq$  2 %; cumple con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla XXIX

Exactitud y Repetibilidad al 100 % para Benzocafina

Muestra	100 % de la cantidad etiquetada ( 50 mg/ cápsula )	% recobro
1	49.535	99.07
2	50.260	100.52
3	50.500	101.00
4	50.285	100.57
5	49.850	99.70
6	50.140	100.29

Promedio del por ciento recuperado = 100.19

Desviación Estándar (DE) = 0.6488

Coefficiente de Variación (CV) = 0.65 %

Ya que, el promedio de recuperación está entre 98-102 % y el CV  $\leq$  2 %; se cumple con los criterios de aceptación establecidos.



Tabla XXX

Precisión ( Reproducibilidad ) para Clorhidrato de Piridoxina

Datos de reproducibilidad en ( % )

		ANALISTA	
		UNO	DOS
D	U	100.85	98.81
	N	99.79	98.94
	O	98.75	100.55
I	D	100.56	99.50
	O	100.01	99.80
	S	100.31	100.02

Tabla de Análisis de Varianza ( ANADEV A )

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F 0.05*
Analista	1	0.5852	0.5852	Fa 2.1538	Fgla/gld 38.51
Día	2	0.5434	0.5234	Fd 0.4972	Fgld/gle 6.06
Error	8	4.3718	0.5464	-----	-----

Interpretación:

Ya que  $F_a < F_{gla/gld}$ ; 0.05 La Metodología Analítica es reproducible por los analistas.

Ya que  $F_d < F_{gld/gle}$ ; 0.05 La Metodología Analítica es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Repetibilidad del Método Analítico = 0.7392

Media Aritmética Total = 99.82

Desviación Estándar Total = 0.7071

Coefficiente de Variación Total = 0.71%

Tabla XXXI

Precisión ( Reproducibilidad ) para Cafeína

Datos de reproducibilidad ( % )

		ANALISTA	
		UNO	DOS
D	U	98.84	99.46
	N	101.95	100.58
	O	100.22	100.23
I	D	100.21	99.10
	O	99.87	99.21
	S	99.94	100.21

Tabla de Análisis de Varianza ( ANADEV A )

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F 0.05*
Analista	1	0.4181	0.4181	Fa 1.2410	Fgla/gld 38.51
Día	2	0.6738	0.3369	Fd 0.4240	Fgld/gle 6.06
Error	8	6.3254	0.7906	-----	-----

Interpretación:

Ya que  $F_a < F_{gla/gld; 0.05}$  La Metodología Analítica es reproducible por los analistas.

Ya que  $F_d < F_{gld/gle; 0.05}$  La Metodología Analítica es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Repetibilidad del Método Analítico = 0.8892

Media Aritmética Total = 99.98

Desviación Estándar Total = 0.8211

Coefficiente de Variación Total = 0.82 %

Tabla XXXII

Precisión ( Reproducibilidad ) para Benzocaína

Datos de reproducibilidad en ( % )

		ANALISTA	
		UNO	DOS
D	U	90.69	90.67
	N	90.55	91.01
	O	90.07	89.35
I	D	90.05	90.02
	O	90.23	90.26
	S	89.84	89.61

Tabla de Análisis de Varianza ( ANADEV A )

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal	F 0.05*
Analista	1	0.022	0.022	Fa 0.097	gla/gld 38.51
Día	2	0.451	0.226	Fd 0.886	gld/gle 6.06
Error	8	2.043	0.255	-----	-----

**Interpretación:**

Ya que  $F_a < F_{gla/gld}$ ; 0.05 La Metodología Analítica es reproducible por los analistas

Ya que  $F_d < F_{gld/gle}$ ; 0.05 La Metodología Analítica es reproducible en distintos días por un mismo analista

Repetibilidad del Método Analítico = 0.505

Media Aritmética Total = 90.19

Desviación Estándar Total = 0.478

Coefficiente de Variación Total = 0.53 %

Especificidad de la muestra

Figura 3. Cromatograma de la respuesta de los Activos

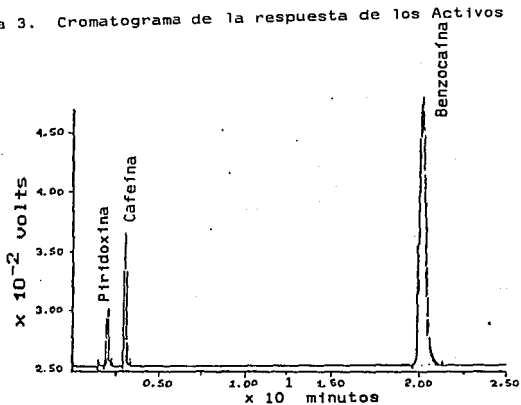
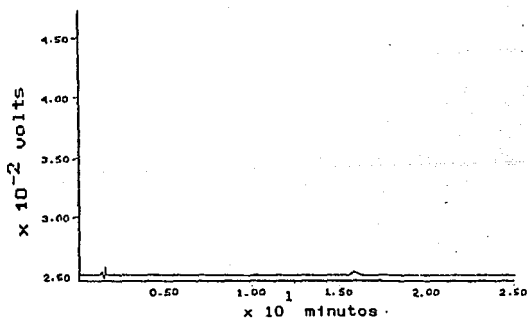


Figura 4. Cromatograma del Placebo del Producto.



Resultado: El método desarrollado, es capaz de cuantificar los Activos de interés, sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

### Estabilidad de la Muestra Analítica

Las condiciones a las que se sometió la solución para el estudio de estabilidad, fueron las siguientes:

- Temperatura ambiente durante 24 horas.
- Temperatura ambiente durante 72 horas.
- Refrigeración durante 24 horas.

Se utilizó una solución de referencia recientemente preparada a cada tiempo de reanálisis, las determinaciones las efectuó un mismo analista.

#### Datos de estabilidad ( % )

Activo	Condición / Tiempo			
	Inicial	T. A. / 24 hrs	T. A. / 72 hrs	Ref/ 24 hrs
Clorhidrato de Piridoxina.	99.45	98.39	98.50	100.56
	99.09	98.46	98.13	98.77
	99.75	98.32	98.25	99.05
Cafeína	99.10	99.55	97.97	99.68
	99.95	98.76	98.05	99.42
	100.20	98.62	97.83	98.35
Benzocaína	91.92	89.98	88.15	91.74
	90.27	89.66	88.42	91.77
	89.62	90.50	87.73	90.64

#### Resultados:

Tabla XXXIII Intervalo de Confianza

Activo	T. A. / 24 hrs	T.A. 72 hrs	Ref/ 24 hrs
Clorhidrato de Piridoxina.	-1.495 a -0.584	-1.653 a -0.626	-1.343 a 1.403
Cafeína	-1.800 a 0.260	-2.591 a -1.008	-1.827 a 0.627
Benzocaína	-2.247 a 1.147	-4.165 a -0.834	-1.039 a 2.599

Tabla XXXIV

Factor I

Activo	T. A./ 24 hrs	T. A./ 72 hrs	Ref/ 24 hrs
Clorhidrato de Piridoxina	98.95 %	98.86 %	100.03 %
Cafeína	99.23 %	98.28 %	99.40 %
Benzocaína	99.40 %	97.25 %	100.87 %

Conclusión: La muestra es estable por 24 horas a condiciones ambientales y en refrigeración, pero NO es estable a condiciones ambientales por 72 horas.

## **CAPITULO 5**

### **DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

Con base en los resultados obtenidos de los diferentes parámetros de validación evaluados, se puede establecer que la Metodología Analítica para determinar Benzocaina, Cafeína, Maleato de Feniramina y Clorhidrato de Piridoxina cumple con:

- Linealidad del sistema. Puesto que se obtuvieron coeficientes de correlación mayores de 0.99 y de variación menores de 1.5 %, en los intervalos de concentración empleados para cada uno de los principios activos ( de 40 % a 160 % para Benzocaina, Cafeína y Feniramina; y de 25 % a 175 % para Benzocaina, Cafeína y Piridoxina ).
  
- Precisión del sistema. Ya que se obtuvieron coeficientes de variación menores de 1.5 %, al hacer 6 inyecciones consecutivas de la solución correspondiente al 100% de cada sustancia
  
- Linealidad del método. Ya que se obtuvieron coeficientes de determinación mayores de 0.98, de variación menores de 2 % y el promedio de recobro está entre 98 - 102 %, al analizar placebos cargados a tres concentraciones diferentes ( 75, 100 y 125 % de la cantidad etiquetada ).



- Exactitud y re-  
petibilidad al 100 %.  
Ya que se obtuvieron coeficientes de variación menores del 2 % y los promedios de recobro están entre 98-102 %, al analizar placebos cargados con la concentración de 100 %, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.
  
- Precisión  
(Reproducibilidad)  
Ya que se obtuvieron coeficientes de variación menores del 2.0 % y cumplieron con el análisis de varianza (ANADEVA), cuando se analizaron muestras del producto por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.
  
- Especificidad  
para Control de  
Calidad.  
Ya que las respuestas obtenidas, son exclusivas de los principios activos que se están cuantificando.
  
- Estabilidad de  
la muestra.  
Se considera 24 horas como el tiempo máximo de almacenamiento, almacenando las muestras analíticas a temperatura ambiente o refrigeración hasta que sea cuantificada. La muestra mostró ser inestable durante 72 horas a temperatura ambiente, ya que no cumplió con el criterio para estabilidad de la muestra analítica.

Por lo tanto puede concluirse que:

Se ha desarrollado la Metodología Analítica por CLAR, para la cuantificación de Benzocaina, Cafeína, Maleato de Feniramina y Clorhidrato de Piridoxina contenidas en microesferas de liberación controlada, la cual cumple con los criterios de aceptación de los parámetros de validación establecidos, para la aplicación del método en Control de Calidad del producto.

A pesar de que el producto es una mezcla de principios activos, el tratamiento previo a su análisis es sencillo, y el tiempo de análisis del producto se redujo considerablemente, minimizando los errores ocasionados por un tratamiento prolongado de la muestra.

## **CAPITULO 6**

### **BIBLIOGRAFIA**

1. The United States Pharmacopoeia XXI,  
National Formulary XVI,  
Mack Publishing Co.,  
Easton P. A., USA, 1985.
  
2. British Pharmacopoeia,  
Published on the recommendation of the Medicine Commission,  
Londres, Inglaterra, 1980,  
Vol. I.
  
3. Blacow, N. W. Martindale.,  
The Extra Pharmacopoeia,  
The Pharmaceutical Press,  
Londres, Inglaterra, 1989,  
págs. 1522-1524.
  
4. Connors, Kenneth.; Amidon A.; Gordon L.; Kennon L.,  
Chemical Stability of Pharmaceuticals. A. Handbook for  
Pharmacists.,  
Jonh Wiley & Sons,  
USA, 1979.,  
pág. 175

5. Levine R. Ruth, Ph. D.,  
Pharmacology: Drugs Actions and Reactions,  
Little, Brown and Company,  
Boston, USA, 1978,  
págs. 455-457.
  
6. Meyers H. Frederik.; Jawetz Ernest.,  
Farmacología Clínica,  
Ed. El Manual Moderno, S. A.,  
México, D. F., 1982,  
págs. 70-73, 290-293, 436-437.
  
7. Aronow L. Ph. D.; Goldstein A.M.,  
Principles of Drugs Action,  
The Basis of Pharmacology,  
Edition Harper International,  
New York 1969,  
págs. 119-124.
  
8. Clarke, E. G.,  
Isolation and Identification of Drugs,  
The Pharmaceutical Press,  
Londres, Inglaterra, 1986,  
págs. 214, 234, 484.

9. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.,  
Quinta Edición,  
México, S. S. A., 1988.

10. The Pharmaceutical Codex,  
The Pharmaceutical Press.,  
11a. Edición,  
Londres Inglaterra, 1979,  
págs. 88, 118-119, 760-767.

11. The Pharmacopoeia of Japan.,  
Society of Japanese Pharmacopoeia,  
Tenth Edition 1981,  
English Version 1982,  
Yakuji Nippo, LTD.,  
págs. 170-171, 562.

12. Goodman, Louis S.; Gilman Alfred.,  
Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica,  
Ed. Interamericana,  
Sexta Edición,  
México, 1984.

13. Litter, Manuel.,  
Compendio de Farmacología,  
Ed. "El Ateneo",  
2a. Edición,  
España, 1980.
  
14. Pratt Robertson. Ph. D.; Osol Arthur. Ph. D.,  
The United States Dispensatory,  
27 th. Edition.  
USA, 1973,  
págs. 206-208, 897-898, 984-986.
  
15. Trujillo Duarte H.; Santander V. M.,  
Índice Farmacológico de Prescripción,  
Ed. Médica Sander's, S. A.,  
México, D. F., 1973.  
págs. 51-53, 150.
  
16. Avery S. Graeme.,  
Principles and Practice of Clinical Pharmacology  
and Therapeutics,  
ADIS Press,  
South Australia, 1980,  
págs. 354-356.

17. Hasson Y. Aboul-Enein.; Mohammed A. Loutfy.,  
Analitical Profiles of Drugs Substances,  
Ed. Klaus Florey,  
Academic Press,  
New York, USA, 1984,  
Vol. 13, pág. 449
  
18. Kastrup Erwin K.; Olin R. Bernie.,  
Drugs Facts and Comparisons,  
Published by Facts and Comparisons,  
St. Louis Missouri, USA, 1989,  
págs. 21-22, 870-872, 1013-1014.
  
19. Helman José.,  
Farmacotecnia Teórica y Práctica,  
Ed. Continental,  
Tercera Impresión,  
México, D. F., 1982,  
págs. 2137- 2161.
  
20. Osol Arthur.,  
Remingtons Pharmaceutical Sciences,  
Mack Publishing Company,  
Easton Pennsylvania, 1980,  
págs. 1594-1602.



21. Popovich G. Nicholas. Ph. D. ; Ansel C. Howard. Ph. D.,  
Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System,  
Lea & Febiger,  
USA, 1990,  
págs. 183-191.
22. Madan L. Parshotam.,  
Pharmaceutical Manufacturing,  
Liberación Prolongada: Parte 2, Preformulaciones,  
March, 1985,  
Vol. 2., Num. 3,  
págs. 41-45.
23. Lachman, L.; Lieberman, H. A.,  
The Theory and Practice of Industrial Pharmacy,  
Lea & Fedinger,  
Philadelphia, USA, 1976,  
págs. 430-445.
24. E. O. Krueger and E. B. Vliet.,  
In Vitro Testing of Time Release Tablets and Capsules,  
Journal of Pharmaceutical Sciences,  
February, 1962,  
Vol. 51, No. 2,  
págs. 181-184.

25. Hess Hans.,  
Formas Farmacéuticas y su Aplicación,  
CIBA-GEIGY, Basilea, Suiza, 1984,  
págs. 13-23.
26. Lehmann, K.,  
Fabricación de Comprimidos Recubiertos de Resina Acrilica  
con Liberación Programada de la Sustancia Activa Según  
Varios Procedimientos de Fabricación,  
A. P. V. Informationsdienst, Vol 18., Num. 1., 1973,  
págs. 3-15.
27. Harold M. Mc. Nair.; Benjamín Esquivel H.,  
Cromatografía Líquida de Alta Presión,  
Ed. Secretaría General de la Organización de los  
Estados Americanos,  
Washington, D. C., 1980,  
págs. 72.
28. Yost R. W.; Etre L. S.; Condon R. D.,  
Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica,  
Ed. Perkin Elmer,  
México, 1980,  
págs. 263.

29. García de Marina A.; Del Castillo B.,  
Cromatografía Líquida de Alta Resolución,  
Ed. Limusa,  
México, D. F., 1988,  
págs. 253.
30. Munson James W.,  
Pharmaceutical Analysis, Modern Methods,  
Drugs and The Pharmaceutical Sciences,  
Marcel de Ker, Inc.,  
N. Y., USA, 1985,  
Vol. II, Part. B,  
págs. 15-76.
31. Snyder L. R.; Kirkland J.L.,  
Introduction to Modern Liquid Chromatography,  
2a. Edición,  
John Willey & Sons, Inc.,  
USA, 1974,  
págs. 453-481.
32. Wessely Karl.; Hewlett-Packard GmbH.,  
High Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical  
Analyses,  
Ed. Hewlett-Packard GmbH, Bo Blingen,  
Western Germany, 1979,  
págs. 48-53.

33. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos

A. C..

Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de  
la Dirección General de Control de Insumos para la Salud,  
SSA.

Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos  
Analíticos..

págs. 74.