



11/201

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

"ADAPTACION Y VALIDACION DE UN METODO  
ANALITICO PARA CUANTIFICAR ALANTOINA EN  
UNA SUSPENSION DE ALANTOINA Y ALQUITRAN  
DE HULLA"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**MARIA ALICIA POSADA MAYA**

MEXICO, D. F.

1990



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.

## INDICE

# I N D I C E

## I. Introducción

## II. Objetivos

## III. Generalidades

1. Generalidades de los Principios Activos.
2. Formulación de la Suspensión y Generalidades de los excipientes.
3. Importancia del Producto.
4. Cromatografía de Partición (CLL) y Potenciometría.
5. Validación de Métodos Analíticos.

## IV. Parte Experimental.

1. Antecedentes.
2. Adaptación de la Técnica Analítica al Producto.
  - a) Cantidad de Empaque.
  - b) Empacado de la Columna.
  - c) Preparación y Tamaño de Muestra.
  - d) Forma de Elución.
  - e) Titulación Potenciométrica de las Muestras.

## V. Validación del Método Analítico.

1. Técnica Analítica.
2. Parámetros del Sistema de Medición.
  - a) Precisión.
  - b) Linealidad.
3. Parámetros del Método Analítico.
  - a) Exactitud.
  - b) Linealidad.
  - c) Reproducibilidad.

d) Estabilidad de la Muestra.

e) Especificidad (Interferencias).

VI. Discusión de Resultados y Comentarios.

VII. Conclusiones.

VIII. Bibliografía.

## I. INTRODUCCION

## I. INTRODUCCION.

Las formulaciones farmacéuticas actuales son mezclas complejas que incluyen, además de uno o más principios activos, una serie de materiales inertes tales como diluyentes, vehículos, colorantes y sabores. Con la finalidad de asegurar la veracidad en el análisis del producto final, es necesario separar de estas mezclas los componentes activos para el análisis cuantitativo. Entre las técnicas analíticas más poderosas de que se dispone para la resolución de estas mezclas existe un grupo de métodos altamente eficientes llamados en conjunto cromatografía.

La cromatografía es una técnica sumamente eficaz de separación de mezclas y de purificación, debe su nombre al hecho de que donde se ha empleado primeramente, ha sido en la separación de colorantes. Fue descrita por primera vez en 1903 por Tswett, un botánico-químico ruso. Aunque él denominó al método cromatografía porque sus estudios tenían que ver con la separación de pigmentos vegetales (del griego Cromato, que quiere decir color), sugirió correctamente que el procedimiento básico podía aplicarse a todos los tipos de compuestos químicos, coloreados o incoloros. Aproximadamente desde 1930, las separaciones fundadas en la adsorción preferencial han cobrado importancia en la metodología analítica. Otra técnica en la que se apoya la química analítica farmacéutica es en los procesos electroquímicos, y en particular las valoraciones potenciométricas.

La potenciometría consiste en la medida de la fuerza electromotriz de una celda galvánica a través de la cual la corriente

que pasa es virtualmente cero, por lo que no tienen lugar cambios importantes en la concentración de las especies electroactivas.

La variable que nos interesa es la modificación de un potencial de un electrodo sencillo o de la celda, en que se tiene lugar variaciones de la concentración de uno o de ambos componentes. En el trabajo analítico la potenciometría es usada en dos formas: una para la determinación de la concentración de un ión por medición directa del potencial de un electrodo, técnica utilizada para la determinación de pH; y otra para localizar el punto de equivalencia de una titulación por medición de la variación del potencial al adicionar una solución titulante.

Las técnicas anteriores, individuales o en forma acoplada con otras muchas más, se utilizan hoy día en el análisis tanto de control de calidad como en el análisis de estabilidad de numerosos productos. Por esta razón, pero principalmente por la responsabilidad que constituye la fabricación de medicamentos, es necesario establecer las condiciones en las cuales el o los métodos empleados proporcionen resultados confiables.

La validación de métodos analíticos es una herramienta útil en la realización de este objetivo, y constituye un factor importante dentro del soporte analítico en las actividades de la Industria Farmacéutica.

Se puede decir que la Industria Farmacéutica persigue tres objetivos fundamentales, siendo estos: luchar para reducir la mortalidad, el esfuerzo para prolongar la vida, y abatir el dolor además de conservar la salud de los seres vivos. Dichos objetivos condicionan la manera de realizar las actividades farmacéuticas, ya que el destino final de los productos es cuando los



consumen personas que se encuentran en desventaja física por padecer una enfermedad, razón por la cual se necesita mantener un estricto control de calidad manteniendo altos niveles de fabricación.

El menor descuido durante el proceso de fabricación de los medicamentos puede afectar la salud de un número considerable de personas cuando consuman productos que no han sido sometidos a constante monitoreo de control de calidad, recayendo la responsabilidad sobre el laboratorio que respalda al producto. Es por eso que se estableció lo siguiente: todo proceso que no este validado se considera fuera de control.

Hoy en día teniendo como marco innumerables métodos analíticos sumamente sofisticados, se dá el caso de poder separar miles de compuestos de muchas formas farmacéuticas. Sin embargo, la base de todos estos métodos, está en los primeros intentos de análisis y en las primeras técnica analíticas satisfactorias. Por eso no es de extrañarse que cuando las características del principio activo impidan el desarrollo o adaptación de alguna técnica analítica actual, se retomen los antiguos sistemas y funcionen aceptablemente. El objetivo, en todo caso es, por tanto, determinar que los productos farmacéuticos contengan el nivel establecido del principio activo para que proporcione al paciente la actividad terapéutica que de él se espera.

El trabajo propuesto a continuación, aunque ofrezca problemas en su aplicación, puede considerarse como una técnica analítica alternativa, que es aplicable cuando no se cuente con los adelantos tecnológicos actuales o cuando estos no funcionen al

cien por ciento de su capacidad. Este, sin lugar a dudas representa un ejemplo de lo que se puede lograr, conjugando sistemas analíticos antiguos con los actuales, que aunque difieran en lo que se refiere a sofisticación, siguen proporcionando una gran ayuda en el trabajo analítico de la industria.

## II. OBJETIVOS

## II. OBJETIVOS

1. Optimizar la técnica analítica encontrada para poder cuantificar Alantoína en la Suspensión.
  - 1.1 Hacer las adaptaciones necesarias para poder realizar el análisis contando con los recursos existentes.
  - 1.2 Determinar durante el desarrollo del trabajo experimental las posibles fuentes de error así como su solución.
  - 1.3 Identificar Alantoína en la fase final de la separación.
2. Validar la técnica analítica una vez adaptada, tomando en cuenta que el método es destinado para control de calidad.
  - 2.1 Hacer el análisis estadístico de cada parámetro con el objeto de concluir si el método presenta algún efecto significativo debido a manipulación.
  - 2.2 Determinar las condiciones en las cuales el método analítico funciona aceptablemente.
  - 2.3 Plantear los inconvenientes del método durante el desarrollo de la técnica.

### **III. GENERALIDADES**

### III. GENERALIDADES.

#### 1. Generalidades de los Principios Activos.

##### ALANTOINA

Alantoína aunque conocida por muchos años puede considerarse como un medicamento nuevo al igual que los derivados de la rauwolfia, alquitrán de hulla y penicilina.

Puede decirse que, aunque el origen de estos medicamentos data de siglos atrás, su aplicación terapéutica precisa fue establecida en tiempo reciente y como resultado de la tecnología moderna.

La Alantoína la descubrió Vanquelin en 1800 y la primera obtención artificial fue realizada por Wohler y Liebring en 1838 al oxidar el ácido úrico con dióxido de plomo. El método de oxidación del ácido úrico es el más frecuente para preparar Alantoína.

La Alantoína es el producto típico de una "oxidación alcalina" del ácido úrico, o bien, es el producto final del metabolismo de las purinas. Sus fuentes principales de obtención son:

A) Origen Animal, pues Alantoína constituye el producto final del metabolismo de las purinas en los mamíferos a excepción del hombre y de los monos antropoides. Es por ello que se le ha encontrado en muy diversos líquidos de organismos animales: orina de vaca, perro, gato y otros mamíferos (en orina humana solo se encuentra en muy pequeña cantidad); líquido amniótico de la vaca (donde fue descubierta), líquido alantóico de la ternera (de donde toma el nombre).

Los insectos también producen Alantoína especialmente las larvas, por ejemplo, las de mosca y las de abeja, así como ciertas clases de gusanos que se usaron durante la Primera Guerra Mundial para sanar heridas infectadas.

B) Origen Vegetal, se encuentra en la cascarilla de arróz, en la corteza del castaño de las Indias, en la remolacha azucarera, en los gérmenes de trigo, en la consuelda (0.8 %), etc. Aunque podemos citar muchas plantas, solamente en la planta de borraja (*Symphitus*), se pudo demostrar, que sus raíces contienen cerca del 1 % de Alantoína.

Durante los años 1934 y 1935 Investigadores del Departamento de Agricultura de E.U.A. publicaron dos informes más extensos sobre esta materia demostrando que la sustancia activa tanto en los extractos de plantas como en materia de origen animal (larvas y gusanos) es Alantoína.

La Alantoína es químicamente (2,5-dioxo-4-imidazolidin) urea denominada también 5-Ureidohidantoína, glioxildiureido, o cordianina. Es un polvo blando, cristalino, blanco y estable, cuya fórmula condensada es  $C_4H_6N_4O_3$  y peso molecular de 158.12. Contiene la siguiente proporción C 30.38 %, H 3.82 %, N 35.44 % y O 30.36 %. Tiene un punto de fusión de 238 °C, cuando son placas prismas monoclinicas recristalizadas de agua. Un gramo se disuelve en 190 ml de agua; 500 ml de alcohol etílico; muy soluble en agua y en alcohol caliente; insoluble en éter. Una solución saturada de Alantoína tiene un pH 5.5. El espectro Ultravioleta de Alantoína a pH 9.4 presenta un máximo de absorbancia de 224 mμ (E = 350) y el espectro Infrarrojo con disco de bromuro de pota-





herida. De hecho esta particularidad proviene de la granulación excesiva.

Dentro del campo de la medicación de origen animal se encuentra el ejemplo del gusano a cuya excreción se le podía atribuir el efecto curativo sobre heridas de cicatrización anormalmente prolongada. Su empleo ha proporcionado resultados excepcionalmente favorables en el tratamiento de ostiomielitis debido principalmente al contenido de Alantoína. El resultado es la formación de granulaciones vasculares sanas con curación consecutiva.

Teniendo en cuenta que la Alantoína es considerada como producto de excreción resultante del metabolismo de los núcleos celulares existe la posibilidad de reutilizar la purinas liberadas en el proceso catabólico. Juzgando por su poder estimulante del crecimiento tisular en zonas donde dicho poder se encuentra detenido, parece que la Alantoína y posiblemente algunas sustancias relacionadas con ella son algo más que productos de desecho. Por el contrario parece que pueden ser normalmente utilizadas para la formación de la estructura nuclear celular misma.

En resumen, Alantoína estimula granulación y epitelización, además de que a través de su acción promotora de la proliferación celular acelera la regeneración del epitelio normal.

Recientemente se ha observado que posee también una acción dispersadora de la queratina, la cual disuelve cierta fracción proteínica del epitelio queratinizado.

## ALQUITRAN DE HULLA.

El Alquitrán de hulla es una sustancia resinosa y empireu-  
mática, que se saca principalmente por destilación de la hulla,  
turba, esquistos, lignito y madera. La hulla es una roca formada  
por la descomposición y transformación de masas sedimentarias de  
vegetales acumulados durante el Carbonífero. Todos los carbones  
menos la antracita, tienen el nombre genérico de hulla II. Por  
oposición a dichos combustibles negros, se emplea a veces el nom-  
bre, seguido de un adjetivo para designar otros manantiales de  
energía.

Existen muchas clases de hulla y ante la dificultad que pre-  
senta su clasificación, se ha adoptado como criterio su contenido  
en materiales volátiles. Cuando se calienta el carbón en ausencia  
de aire, se descompone parcialmente en sustancias más simples y  
volátiles las que se destilan; el residuo es el coque. Los mate-  
riales volátiles son el gas de carbón y un líquido que correspon-  
de al alquitrán. Por destilación del alquitrán, se obtienen va-  
rios compuestos aromáticos. Por coquificación, una tonelada de  
lignito puede rendir hasta 55 Kg de alquitrán, de los que se pue-  
den separar los siguientes compuestos aromáticos:

| COMPUESTO AROMÁTICO | Kg   |
|---------------------|------|
| Benceno             | 1.00 |
| Tolueno             | 0.25 |
| Xilenos             | 0.05 |
| Fenol               | 0.25 |
| Cresoles            | 1.00 |
| Naftaleno           | 2.20 |

Desde el punto de vista industrial se distinguen las siguien-

tes clases de hulla: hullas magras, que no se aglutinan, contienen menos del 15 % de materias volátiles y constituyen carbones domésticos e industriales. Hullas semigrasas, que contienen hasta 22 % de materias volátiles, que son ligeramente aglutinantes. Hullas grasas, que contienen hasta 40 % de materias grasas, y por último, hullas secas, con más de 40 % de sustancias volátiles que dan llamas largas y son poco aglutinantes.

El alquitrán de hulla que, como se mencionó anteriormente, se obtiene de la destilación seca de sustancias orgánicas, es un líquido con aspecto de aceite de color negro o pardo muy oscuro. Es más denso que el agua, posee un olor característico semejante al naftaleno y produce una sensación quemante en la lengua. Es parcialmente soluble en acetona, en alcohol, en disulfuro de carbono, en cloroformo, en éter, en metanol y en hexano. Se solubiliza ligeramente en agua a la cual le imparte olor y sabor característico, además de que al mezclarlos da una solución de aspecto lechoso. Es más soluble en benceno, solo aproximadamente el 5 % permanece sin disolver y es casi completamente soluble en nitrobenzeno; solo una pequeña cantidad de materia es insoluble quedando suspendida en la solución.

En cuanto a su acción farmacológica se menciona que los alquitranes medicinales son queratoplásticos (estimulantes) y queratolíticos (destructivos) dependiendo de la concentración usada. En dilución apropiada los alquitranes obran como irritantes ligeros y como antisépticos. Su efecto es intensificado por la luz ultravioleta que por si misma altera la epidermis.

Son preparados oficiales de alquitrán de hulla, United Sta-

tes Pharmacopeia, alquitran de pino y alquitran de enebro ambos National Formulary. De los anteriores el alquitran de hulla es el más empleado el cual se incluye en la suspensión, tema principal de este trabajo.

Los alquitranes suelen prescribirse en pomadas de alquitran de hulla (1 % de alquitran de hulla en pasta de óxido de zinc); a una concentración de 5 a 10 % de los shampoos antiseborreicos y se aplica en capa delgada directamente en las lesiones psoriáticas y enfermedades cutáneas así como en dermatitis eccematosa.

El origen de la terapia con alquitran de hulla data de hace más de 2000 años. De hecho la literatura médica está repleta de referencias sobre el uso de alquitran de hulla en el tratamiento, como se mencionó antes, de psoriasis y otras dermatitis.

Existen terapias en las cuales se alterna el uso de alquitran de hulla con el de la aplicación de luz ultravioleta, mercuriales, salicilatos, esteroides, etc.

## 2. Formulación de la Suspensión y Generalidades de los Excipientes.

La Suspensión de Alantoína y Alquitran de Hulla es un líquido viscoso (máximo 1200 cp) homogénea, sin grumos, de aspecto cremoso, color amarillo y olor característico a alquitran de hulla. Al aplicarse sobre la piel deja una película blanca que desaparece por frotación constante. Tiene una gravedad específica de 0.98 a 1.0 g/ml y un pH aparente de 5.74. Cada 100 ml de suspensión contiene:

| COMPONENTE                             | g         |
|--|-----------|
| Alantoína                              | 2.000     |
| Alquitrán de hulla                     | 0.940     |
| Palmitato de isopropilo                | 2.625     |
| Monosteárate de polietilen glicol 1540 | 4.200     |
| Propilen glicol 400                    | 5.250     |
| Petrolato líquido                      | 5.250     |
| Goma de tragacanto                     | 0.480     |
| Metilparabeno                          | 0.105     |
| Alcohol cetílico                       | 1.575     |
| Propilparabeno                         | 0.010     |
| Esperma sintética de ballena           | 2.100     |
| Lauril sulfato de sodio                | 2.625     |
| Agua purificada c.b.p.                 | 100 ml de |

suspensión

Para su mejor conservación, la suspensión de Alantoína y alquitrán de hulla es envasada en frascos ámbar de polietileno conteniendo un volumen promedio de 120 ml.

A continuación se citarán las características más específicas de cada uno de los excipientes que constituyen la formulación:

#### PALMITATO DE ISOPROPILO.

Líquido móvil por lo general incoloro e inodoro, con un sabor ligero. Tiene una densidad entre 0.850 a 0.855 g/ml.

Insoluble en agua y glicerol; soluble uno en tres partes de alcohol; miscible con líquidos hidrocarbonados y aceites compuestos. Incompatible con parafina dura, produciendo una mezcla granular.

Este material es resistente a la oxidación e hidrólisis no llegando a enranciarse. Está libre de propiedades irritantes y sensibilizantes y es absorbido rápidamente por la piel. Es usado en preparaciones tópicas en sustitución de aceites vegetales, y en cremas y ungüentos emolientes, dando productos que son relativamente libres de grasa.

Es solvente de muchas sustancias aplicadas externamente y es de gran valor como vehículo cuando se requiere contacto y penetración directa del medicamento.

#### MONOESTEARATO DE POLIETILEN GLICOL 1540.

Es un polímero de óxido de etileno y agua, representado por la fórmula  $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{-OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$  donde, en promedio,  $n$  va 28 a 36 átomos de carbono. Tiene un peso molecular promedio no menor a 1296 y no mayor a 1648.

Monoestearato de polietilen glicol 1540 es un material blanco, ceroso, plástico, teniendo una consistencia similar a cera y un ligero olor característico.

Este polímero es libremente soluble en agua. Su solubilidad en alcohol deshidratado es limitada, no así en cloroformo, en el cual es libremente soluble. Prácticamente es insoluble en éter.

Una solución de 5 g de monoestearato de polietilen glicol en 50 ml de agua es prácticamente clara e incolora. El pH de una solución acuosa de este material (1 en 20) está entre 4.0 y 7.0.

#### PROPILEN GLICOL 400 (1,2-Propanodiol).

Fórmula condensada  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$  y peso molecular 76.10. Es un líquido denso, claro, incoloro, viscoso que posee un ligero y característico sabor, es prácticamente inodoro y absorbe humedad cuando se expone al aire. Posee una gravedad específica de

1.037 g/ml.

Es miscible con agua, con acetona y cloroformo. Es soluble en éter y puede disolver algunos aceites esenciales, pero no así a los aceites compuestos.

#### PETROLATO LIQUIDO.

Es una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenida del petróleo que puede tener un estabilizador adecuado. Es un líquido oleoso, incoloro, transparente y libre o cercanamente libre de fluorescencia. Es inodoro e insípido cuando se enfría, y desarrolla no más que un ligero olor a petróleo cuando se calienta.

Es insoluble en agua y en alcohol; soluble en aceites volátiles. Miscible con muchos aceites compuestos, pero no con aceite de castor. La gravedad específica del petrolato líquido no es menor que 0.845 y no mayor a 0.905 g/ml.

#### GOMA DE TRAGACANTO.

Es la exudación gomosa desecada del Astragalus gummifer (familia Leguminosae) o de otras especies de Astragalus. Se presentan como cintas delgadas, aplanadas de aproximadamente 30 ml de longitud, más o menos curvas, que presentan en su superficie finas estrias longitudinales y protuberancias concéntricas transversales. Son de color blanco o amarillo pálido, translúcidas y de fractura corta. Se vuelven más fácilmente pulverizables por calentamiento a 50 °C. Al agregarles una pequeña cantidad de agua se forma un gel mucilaginoso.

La goma de tragacanto que se destina a la fabricación de la suspensión es pulverizada.

METILPARABENO (p-hidroxibenzoato de metilo).

Fórmula condensada  $C_{16}H_{32}O_2$  y peso molecular 152.12. Son cristales pequeños incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro o con olor débilmente característico y sabor ligero quemante.

Es poco soluble en agua, en benceno y en tetracloruro de carbono, muy poco soluble en agua caliente pero muy soluble en alcohol; soluble en éter. La temperatura de fusión está comprendida entre 125 y 128 °C.

#### ALCOHOL CETILICO.

Se le conoce también como hexadecanol, ethal o alcohol palmítico, cuya fórmula condensada es  $CH_3(CH_2)_{14}CH_2OH$  y peso molecular de 242.43. Son escamas blancas, suaves, cuya densidad fluctúa entre los 0.811 g/ml, funde a los 49 °C y posee un índice de refracción  $n = 1.4283$ .

Es insoluble en agua pero se solubiliza con facilidad en alcohol, cloroformo y éter.

Su uso dentro de la industria farmacéutica y de cosméticos es como emulsificante y emoliente.

#### PROPILPARABENO (p-hidroxibenzoato de propilo).

Fórmula condensada  $C_{10}H_{12}O_3$  y peso molecular de 180.21. Son cristales pequeños incoloros o polvo blanco. Es muy ligeramente soluble en agua y libremente soluble en alcohol y éter; ligeramente soluble en agua caliente. Tiene un rango de fusión entre 95 y 98 °C.

Junto con el metilparabeno se utilizan en la industria como conservadores antimicrobianos.

#### ESPERMA SINTETICA DE BALLENA.

Es una masa blanca y ligeramente untuosa que presenta un lustre perlado. Tiene un ligero olor delicado y está libre de



rancidez, aunque esto no significa que pueda enranciarse. Su gravedad específica es de aproximadamente 0.94 g/ml.

Es insoluble en agua, soluble en alcohol caliente, en éter, en cloroformo y en aceites volátiles y compuestos; ligeramente soluble en hexano frío y prácticamente insoluble en alcohol frío.

Originalmente la esperma de ballena era una sustancia cerosa obtenida del calentamiento de la esperma de ballena Physeter macrocephalus (familia Physeteridae). Actualmente se sintetiza y es destinada para uso industrial. Presenta un rango de fusión entre 42 y 50 °C.

#### LAURIL SULFATO DE SODIO.

Fórmula condensada  $C_{12}H_{25}NaO_2S$  y peso molecular 288.38. Son cristales blancos o amarillentos. También puede estar en forma de hojuelas o polvo. Posee un olor característico a sustancias grasas y da una reacción neutral. Un gramo se disuelve en 10 ml de agua dando una solución opalescente. Se utiliza en la industria para emulsificar grasas además de que baja la tensión superficial de soluciones acuosas.

Como se puede apreciar, la suspensión de Alantoína y alquitrán de hulla contiene una serie de materiales que le dan una consistencia especial para mantener en suspensión al principio activo.

Haciendo una observación de la apariencia del producto, se puede apreciar que tiene un aspecto terso, no observándose a simple vista las partículas de Alantoína, debido a que debe cumplir como materia prima, que no menos del 95 % debe pasar malla 200, para asegurar que el tiempo de sedimentación del principio

activo sea mayor.

Se observó también que la suspensión dérmica pierde su consistencia fluida con la exposición constante al aire.

Es importante que la suspensión de Alantoína y alquitran de hulla conserve sus características físicas, tanto como para proporcionar el efecto terapéutico deseado, así como para poder realizar un análisis confiable.

### 3. Importancia del Producto.

La Psoriasis no es una enfermedad mortal y no afecta materialmente la salud del individuo. Por lo general, en estos casos, se trata de acostumar al paciente para que acepte su condición.

En general el paciente psoriático no manifiesta síntomas que interfieran con sus funciones físicas normales, como puede ser fiebre o dolor. Sencillamente es un individuo acomplejado por su condición y en consecuencia limita su desenvolvimiento social y profesional.

Se puede definir la Psoriasis como una enfermedad crónica, recurrente, caracterizada por un enrojecimiento persistente de la piel, la cual presenta lesiones redondas, generalmente resacas y cubiertas por escamas plateadas. Sigue un curso caracterizado por remisiones y recurrencias que en algunos casos, se puede dar alivio, cambiando a un clima más cálido.

El caso típico de la Psoriasis comienza con pequeñas lesiones en forma de gota, localizadas por lo general en codos, rodillas, muñecas y hombros. Las lesiones se extienden presentando escamas las cuales al ser removidas, dejan ver la piel enrojecida y con pequeños puntos hemorrágicos.

La etiología de la Psoriasis es aún desconocida y hasta el presente no se ha descubierto ningún medicamento que represente la cura para la Psoriasis. Solo podemos hablar de mejora o alivio y aclaración de las lesiones.

Como es de esperarse se han utilizado innumerables tratamientos locales y sistémicos contra la Psoriasis. Hasta el pre-

sente, los tratamientos sistémicos utilizados comprenden regímenes alimenticios, drogas que actúan sobre el metabolismo, hormonas, compuestos de naturaleza diversa y tratamientos psiquiátricos, los cuales han demostrado su ineffectividad.

Los fracasos sufridos en los tratamientos sistémicos han limitado el tratamiento de la Psoriasis a la aplicación local de diferentes agentes. Quizá el agente típico más comunmente utilizado es el alquitrán de hulla asociado a Alantoína. A ésta última se le ha atribuido, como se mencionó anteriormente, la capacidad de estimular el crecimiento de tejido y junto con la acción antiséptica del alquitrán de hulla, se consigue una terapia que, si no erradica totalmente la enfermedad, sí consigue un alivio de las molestias presentadas.

La Psoriasis es una enfermedad que tiene una prevalencia estimada en un 0.5 a 2.8 % de la población mundial. En México no se tienen estadísticas de su incidencia, pero se cuenta con reportes que indican su importancia como un padecimiento dérmico en el que influyen factores ambientales y hereditarios, en la mayor parte de los casos. Parece ser que la Psoriasis se presenta en grupos raciales localizados en una situación geográfica específica.

Por ejemplo, dos estudios realizados en la población de Escandinavia, mostraron que la incidencia de la enfermedad oscilaba entre 1.4 y 2.8 %. De esta población la edad inicio de la enfermedad fue de 12 años para mujeres y de 13 años para los hombres. En este estudio se llegó a la conclusión de que el factor aislado más importante es el medio ambiente y se sugirió que mientras más temprana sea la edad de inicio de la enfermedad, los factores ambientales afectarán el padecimiento con mayor intensidad.

Dado que no existe a la fecha medicamento que cure la Psoriasis, la suspensión de Alantoína y alquitran de hulla representa un medicamento importante ya que es utilizado en la terapia para ayudar a reducir considerablemente las heridas causadas por dicha enfermedad.

#### 4. Cromatografía de Partición (CLL) y Potenciometría.

En el desarrollo de este trabajo, para la cuantificación de Alantoína se utilizaron los métodos de Cromatografía de Partición (CLL) y Potenciometría, mismos que se describen a continuación.

##### CROMATOGRAFIA DE PARTICION.

La Cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial mientras que la otra es líquida y se mueve a través de la superficie de la parte fija o sobre ella. Los componentes de la mezcla deben poseer dimensiones moleculares, lo que requiere que estén en solución o en el estado de vapor. La afinidad relativa de los solutos para cada una de las fases debe ser reversible para asegurar que hay transferencia de masa durante la separación Cromatográfica.

La fase fija se llama fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido puesto en capa delgada sobre un material de soporte inerte. Es necesario que la fase estacionaria posea partículas tan pequeñas como sea posible para que exista una superficie grande de modo que la adsorción y desadsorción de los solutos se verifiquen frecuentemente. La fase móvil puede ser un líquido puro, una mezcla de soluciones o bien ser un gas.

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo con la naturaleza de las fases estacionaria y móvil. Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se llama cromato-

grafía de adsorción, mientras que si la fase estacionaria es un líquido, se le llama cromatografía de partición.

A continuación se hará mención únicamente de la cromatografía de partición misma que se empleó en el desarrollo de este trabajo.

En la cromatografía de partición un material sólido inerte, tal como gel de sílice o tierra de diatomeas, sirve para apoyar una capa delgada de líquido que es la fase estacionaria efectiva. A medida que la fase móvil que contiene el soluto pasa muy cerca de esta fase líquida, hay retención y separación debido a la solubilidad relativa de los componentes analizados en los dos líquidos según lo determinan sus coeficientes de partición. Dicho lo anterior y observando las características cromatográficas de la técnica utilizada en el presente trabajo el proceso empleado se llama cromatografía de partición líquido-líquido (CLL).

La cromatografía de partición líquido-líquido resulta ser análoga al proceso de transferencia de solutos que ocurre en la extracción por solventes. En dicha extracción un soluto usualmente disuelto en un vehículo acuoso se transfiere parcialmente en un paso a un solvente no miscible. La cantidad de soluto transferido se determina por medio de un coeficiente de partición, que es la relación entre su concentración, en las fases no acuosa y acuosa, respectivamente. Después del primer paso, las capas se separan, se coloca en contacto nuevo solvente con la fase acuosa y como resultado de ello se establece un nuevo equilibrio basado en el coeficiente de partición, y se transfiere más soluto a la fase no acuosa. Cada una de estas extracciones es equivalente a un plato teórico en un sistema cromatográfico.

El método empleado en este trabajo podría parecer contradictorio, con base a lo anteriormente explicado. A continuación se expondrá lo que realmente sucede.

Para la separación cromatográfica de Alantoína lo fundamental es que el principio activo sea retenido por la fase estacionaria que impregna el soporte y no sea arrastrado por la fase móvil, la cual en este caso, se encarga únicamente de separar los excipientes que constituyen la formulación. Es por esto que el valor de coeficiente de partición, que convencionalmente relaciona la concentración de soluto disuelto en fase no acuosa con el soluto disuelto en la fase acuosa, sea pequeño ( $3 \times 10^{-3}$ ), lo que indica que Alantoína, en la fase estacionaria es esencialmente inmóvil.

Como se mencionó anteriormente, los procesos cromatográficos se clasifican de acuerdo con los estados físicos de las fases móvil y estacionaria. Cada una de estas técnicas pueden a su vez ser clasificadas según el método de desarrollo de la fase móvil. El análisis de elución es la técnica más frecuentemente usada de desarrollo cromatográfico.

El análisis de elución se lleva a cabo mediante la introducción de la muestra en un volumen tan pequeño como sea posible sobre la parte superior de la columna. Se deja fluir la fase móvil a través del sistema. Los componentes que posean coeficientes de partición más grandes serán retardados en su pasaje a través del sistema y eluirán más tarde.

La ventajas de la cromatografía de elución son que cada componente de una mezcla puede ser aislado en un estado relativa-



mente puro, solo contaminado por la fase móvil, y que el método puede ser fácilmente utilizado para el análisis cuantitativo. Si no se cambia la fuerza de la fase móvil durante el desarrollo del cromatograma, la técnica se llama análisis de elución isocrática.

Una modificación ampliamente usada del análisis de elución, que es capaz de superar las dificultades de tiempos de elución largos y de una mala resolución de mezclas complejas, se llama análisis de elución en gradiente. En esta adaptación dos solventes eluyentes, uno débil y otro fuerte se usan para desarrollar el cromatograma. El solvente débil posee menor afinidad por los solutos, mientras que el fuerte posee mayor afinidad. La elución comienza usando solo el disolvente débil y a medida que el desarrollo progresa se mezcla el solvente más fuerte hasta que la fase móvil final posea una composición que se aproxima a la del solvente fuerte. La mezcla se hace en una cámara especialmente diseñada colocada en la parte superior de la columna. El resultado es tal que la composición y la fuerza de la fase móvil cambian constantemente durante el análisis. Los solutos débilmente retenidos, eluyen primero por el solvente débil, y los solutos fuertemente retenidos, que no eluirán para nada con el solvente débil o que poseerían tiempos de retención indeseablemente largos, son eluidos por la fase móvil crecientemente más fuerte.

Las formas básicas de la cromatografía pueden aplicarse al análisis de sistemas farmacéuticos a través del uso de una serie de técnicas que difieren una de la otra de acuerdo con la naturaleza de la fase estacionaria y al aparato utilizado para realizar la cromatografía. La elección de una técnica en particular depen-

de de una serie de factores, incluyendo la complejidad de la muestra, las propiedades químicas y físicas de los compuestos a separar, la resolución requerida, la facilidad y rapidez de la técnica y su capacidad para ser automatizada, la disponibilidad y el costo del equipo y la necesidad de aislar las sustancias separadas.

Por ejemplo, si es preciso aislar compuestos eluidos en cantidad, entonces una elección más ventajosa puede ser la cromatografía de partición líquida o la cromatografía en capa delgada. Así también, las sustancias que no son ionizables, hidrofóbicas o no polares, pueden ser separadas mediante métodos de adsorción líquida.

El equipo experimental para realizar cromatografía en columna clásica es relativamente sencillo. La columna dentro de la cual se empaqueta la fase estacionaria consta de un tubo de vidrio o teflón de 10-50 mm de diámetro y 5-100 cm de largo, aunque se han usado columnas mucho más largas para separaciones difíciles y trabajos preparativos. El fondo de la columna se ajusta con una llave u otro tipo de restricción al flujo con el fin de dar control sobre la velocidad de pasaje de la fase móvil. El material de empaque se soporta dentro de la columna con ayuda de un disco de vidrio poroso o una pieza de lana de vidrio.

El empaquete puede ser introducido en la columna como polvo seco o una suspensión en la fase móvil. En cualquiera de los casos es esencial que el lecho cromatográfico sea uniforme sin burbujas de aire o canales que interrumpan el flujo de la fase móvil. Si se empaqueta en forma seca, la fase estacionaria se introduce en pequeñas cantidades y se deja asentar con ayuda de un

suave golpeteo o una vibración fuera de la columna. Si se usa una técnica de introducir una suspensión se deja la llave abierta para dejar que el solvente fluya a través del material sólido y se agrega solvente, cuando sea necesario, para evitar que se seque la columna, mientras que se dan golpecitos para expulsar las burbujas de aire. Cuando el lecho cromatográfico ha alcanzado la altura deseada, se cierra la llave y se deja una capa de fase móvil encima del lecho. Cuando se usa la suspensión, se puede utilizar presión positiva o vacío así como también una varilla de vidrio para asegurarse de que el material está firmemente empacado.

La muestra encima de la columna se coloca de dos modos. Puede mezclarse con una pequeña porción de la fase estacionaria que entonces se empaca como se indicó o puede disolverse en la fase móvil y depositarse sobre el lecho cromatográfico después de que se ha dejado correr la fase móvil una corta distancia dentro de la fase estacionaria. Se agrega entonces más fase móvil y se abre la llave para dejar que comience a fluir. Se puede entonces desarrollar el cromatograma dejando que fluya el solvente desde un reservorio bajo la fuerza de la gravedad, dado que este método da velocidades de flujo variables debido a cambios de presión o temperatura, introduciéndolo a baja presión usando una bomba peristáltica. El efluente que sale de la columna se recoge en fracciones en función del tiempo o del volumen y los eluidos se analizan para buscar la presencia de los diversos solutos.

Como se puede apreciar, existen muchas técnicas cromatográficas las cuales varían según las necesidades del análisis. En

nuestro caso se aprovechan las diferentes solubilidades de los excipientes de la formulación para separarlos de Alantoína, así como el cambio de fuerza del eluyente de menor a mayor polaridad.

Todo lo antes mencionado constituye como tal, las condiciones ideales para la realización de una cromatografía, que durante el trabajo experimental pueden o no llegar a cumplirse.

## POTENCIOMETRIA.

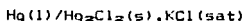
Conceptualmente, puede considerarse a la Potenciometría como la medida de la fuerza electromotriz (f.e.m.) en una celda galvánica. Esta f.e.m. es generada, para nuestros fines por una reacción química verificada en la solución que contiene una especie susceptible de reaccionar con una solución de concentración conocida. Esta metodología llamada valoración potenciométrica suele emplearse en el análisis cuantitativo y para realizarla, es necesario construir una pila galvánica con la solución de interés en la cual se sumerge un par de electrodos. Posteriormente se sigue la f.e.m. verificada en la pila, la cual esta en función del volumen del reactivo valorante adicionado. cuando la solución presente variaciones bruscas de potencial, esto indicará que la reacción es completa por estar en la región cercana al punto de equivalencia.

La medición de la f.e.m. en la celda es realizada por un potenciómetro el cual es capaz de medir potenciales entre 0 y 1.5 volts con una exactitud comprendida preferiblemente de 0.001 a 0.002 volts. Este instrumento realiza las mediciones de voltaje empleando una corriente mínima. Es por esto que se le considera un instrumento a cero que utiliza un galvanómetro como detector de equilibrio. El galvanómetro únicamente indica el punto de equilibrio de una f.e.m. desconocida (la registrada por el electrodo indicador y una f.e.m. opuesta que se conoce (la registrada por el electrodo de referencia).

Durante lo antes expuesto se han mencionado dos dispositivos fundamentales en la medición del potencial: los electrodos de referencia e indicadores.

El electrodo de referencia es un dispositivo que posee un potencial constante e independiente en el transcurso de una valoración. Un buen electrodo de referencia debe dar potenciales reproducibles y presentar un comportamiento constante durante el paso de pequeñas corrientes, así como de fácil montaje.

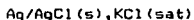
El electrodo de referencia mayormente utilizado es el electrodo de calomelanos saturado cuya reacción electródica viene dada por la siguiente ecuación:



cuyo potencial a 25 °C es de 0.242 volts.

La forma comercial más común consta de un tubo de 5 a 10 cm de diámetro, que contiene a su vez un tubito interno lleno de pasta de mercurio y cloruro de mercurio (I), conectada a una solución saturada de cloruro de potasio del tubo exterior por medio de un pequeño orificio.

Otro electrodo de referencia es el electrodo de plata-cloruro de plata el cual representa un sistema electródico análogo al anterior. Este consiste en un electrodo de plata sumergido en una solución cloruro de potasio saturada de cloruro de plata:



Este electrodo se prepara con una solución saturada de cloruro de potasio siendo entonces su potencial a 25 °C igual a +0.197 volts con referencia al electrodo normal de hidrógeno.

Los electrodos indicadores por su parte deben estar relacionados directamente con la concentración de una o más de las espe-

cies susceptibles de reaccionar en la determinación analítica. Esto implica que si el potencial del electrodo de referencia es constante las variaciones de la f.e.m. que se registran, reflejarán, entonces, las variaciones de concentración que se llevan a cabo en la solución en el transcurso de la valoración. Es por esto que se necesita una respuesta rápida ante las variaciones de concentración.

Durante la medición del potencial en la valoración de Alan-toina, se emplea un tipo de electrodo combinado, es decir, dicho electrodo contiene al electrodo indicador y al de referencia en un mismo dispositivo. El electrodo de referencia es el de calomelanos y el de medida es un electrodo de vidrio el cual es ampliamente utilizado en las valoraciones de neutralización y determinación de pH.

Dicho electrodo, posee una delgada membrana de vidrio conductora, que interpuesta en dos soluciones a pH diferentes crea una diferencia de potencial, por haber transferencia de iones hidrógeno a través de la membrana. Para que dicha transferencia sea continua, la membrana de vidrio debe contener agua en su estructura para que sea efectivo como indicador de pH.

El vidrio empleado en la fabricación de estos electrodos es un vidrio sodio-cálcico, el cual presenta una resistencia eléctrica de alrededor de 100 megohms.

El electrodo del vidrio convencional consta de un tubo de vidrio que tiene en un extremo la membrana sensible a la transferencia de iones hidrógeno. Una solución diluida de ácido clorhídrico esta contenida dentro del tubo, la cual baña a un hilo de plata cubierto de cloruro de plata.

Durante la determinación del potencial usando un electrodo de vidrio, y en contraste con otros electrodos, no se presentan interferencias si en la solución se encuentran oxidantes fuertes, reductores, proteínas y muchas otras sustancias más. Tal es el caso por el que dicho electrodo se ha utilizado para medir el pH de fluidos viscosos e incluso semisólidos.

Como se puede apreciar, existen múltiples avances en las volumetrías potenciométricas, tal es el caso de los tituladores automáticos los cuales, tras la adición del titulante por inyección de una cantidad preestablecida de solución valorante, registra los valores del potencial y en consecuencia el punto final de la valoración.

La determinación del punto final puede realizarse por determinación gráfica en forma directa o empleando el criterio de la primera y segunda derivada. En la determinación gráfica, que es la más directa consiste en apreciar visualmente el punto medio de la porción de la curva de valoración que asciende rápidamente por variación de la f.e.m.. El procedimiento de la primera y segunda derivada consiste en representar gráficamente las variaciones de potencial por unidad de volumen agregado ( $E/ml$  y  $E/ml$  respectivamente) en función del volumen medido añadido.

En ambos procedimientos los valores obtenidos se grafican en papel milimétrico para poder apreciar el punto de equivalencia. Estos procedimientos fueron empleados en las valoraciones manuales, pero ahora que se cuenta con el titulador potenciométrico automático, se lee directamente el volumen de titulante consumido en el punto final.



Es un hecho que la metodología instrumental en la potenciometría ha variado en el transcurso de estos años, pero sustenta en el fondo el mismo principio explicado anteriormente.

Sin embargo debe hacerse énfasis que si no es conocido en esencia el fundamento de esta técnica analítica, los resultados obtenidos no son reproducibles.

## 5. Validación de Métodos Analíticos.

"La validación de métodos analíticos, es un proceso mediante el cual, queda establecido por estudios de laboratorio, que las características del método cumple con los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas". Tal es la definición publicada en "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays" de la publicación "Pharmacopeial Forum" del bimestre marzo-abril de 1986. Pero tal definición indica únicamente, lo que en el medio analítico se espera de una validación, sin tomar en cuenta todo lo que esta palabra significa.

La necesidad de validar como tal, nace desafortunadamente debido a dos errores cometidos en la industria farmacéutica de E.U.A. e Inglaterra. Dichos errores costaron la vida de personas que consumieron los productos contaminados. Esto llevó a los farmacéuticos a establecer una serie de normas y procedimientos para asegurar que los procesos productivos se llevaran a cabo de una manera controlada desde un principio. En consecuencia, y como necesidad de verificar lo anterior, en el laboratorio de control de calidad se creó la necesidad de saber con certeza que las técnicas analíticas dieran resultados confiables. Como se puede apreciar la validación juega un papel muy importante dentro del aseguramiento de la calidad. Con esto se espera expresar la necesidad e importancia de la validación. En este capítulo únicamente se hablará a cerca de la validación de la tecnología analítica por ser consecuencia de la parte experimental desarrollada.

Como ya se mencionó la validación de métodos analíticos juega un papel muy importante, por que los resultados obtenidos de los analistas son un punto de apoyo para la toma de decisiones

en cuanto a la disposición de materia prima como de producto terminado en las áreas productivas.

Dentro de la industria farmacéutica moderna la validación de métodos analíticos constituye un soporte importante dentro del campo de:

- **Preformulación:** para la caracterización fisicoquímica del principio activo en una formulación tentativa.
- **Estabilidad:** para el desarrollo de métodos altamente específicos como indicadores de estabilidad.
- **Estudios biofarmacéuticos** (no desarrollados en todas las industrias): para seguir el curso biológico y farmacocinético de un principio activo y utilizando métodos específicos y selectivos para fármacos, con el fin de cuantificar en los diferentes fluidos biológicos.

Antes de abordar específicamente la validación de métodos analíticos, quisiera hacer mención de algunas definiciones publicadas en "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays" de la Pharmacopeial Forum del segundo bimestre de 1986, las cuales son fundamentales en la concepción esencial de la validación de metodología analítica. Estas definiciones constituyen los parámetros analíticos, términos en los cuales se expresan las características del método.

"Precisión: la precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. La precisión de un método analítico es usualmente expresada como la desviación estándar o

la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). La precisión es una medida del grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación".

"Exactitud: la exactitud de un método analítico es la concordancia entre los valores obtenidos por el método y los valores verdaderos. La exactitud puede ser expresada como porcentaje de recobro de cantidades conocidas adicionadas".

"Linealidad: la linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado. La linealidad es usualmente expresada en términos de varianza alrededor de la línea de regresión de acuerdo a dicha transformación matemática para los resultados obtenidos por el análisis de muestras a diferentes concentraciones".

"Reproducibilidad: es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos".

"Repetibilidad: es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista usando los mismos aparatos y técnicas".

"Especificidad: la especificidad es la medida del grado de interferencia (o ausencia de estas), en el análisis de mezclas complejas. Es la habilidad de un método analítico para obtener

una respuesta debida únicamente a la substancia 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 obtenidos por el análisis de las mismas muestras bajo variaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, ensayo a diferentes tiempos, ensayo a diferentes temperaturas, diferentes días, etc."

Estos son algunos de los parámetros mayormente utilizados para validar métodos analíticos. Sin embargo no son todos ni los únicos. Constituyen solo una base, ya que dadas las características del método analítico y a las necesidades existentes, se establecerán los parámetros a evaluar. Se puede decir entonces que estos parámetros satisfacen los requisitos mínimos para considerar un método analítico satisfactoriamente validado.

Varios factores son los que determinan la elección de una técnica de separación, por ejemplo:

- La naturaleza de las muestras respecto a los constituyentes presentes y su relación entre sí.
- La naturaleza química y el número de componentes por determinarse.
- Así como la aplicabilidad de las técnicas, es decir, qué tan eficiente es el método para recuperar el constituyente principal, dependiendo de los requerimientos del procedimiento, de acuerdo con la naturaleza, tamaño, tiempo empleado en cada análisis, equipo necesario y del disponi-

ble, etc.

Resumiendo lo anterior se puede decir que la elección de una técnica depende de la información que se desea obtener de ella.

Para ello es necesario recurrir a fuentes de información bibliográfica (libros, artículos, etc.), para que después en base a ello se establezca el equipo, material y demás necesidades indispensables para reproducirlo con las menores variaciones. Al realizar las pruebas correspondientes, una vez desarrollado o adaptado el método, se procede a describir detalladamente el procedimiento experimental, con el objeto de evaluar los parámetros mínimos de validación. Después, anotar las posibles fuentes de variación, así como las medidas para evitarlas. Con estos datos se realiza un reporte anotando todos y cada uno de los parámetros evaluados y la conclusión a que se llegó.

Es importante seguir una metodología similar a la anterior para poder abordar un problema analítico con el menor número de variaciones. Estas, como es de esperarse, son difíciles de erradicar. Sin embargo se establece que dichas variaciones ocurren debido a uno o a todos, de los siguientes factores:

- El material o producto por analizarse.
- Los reactivos y equipo utilizados en el desarrollo de la técnica analítica.
- Que el equipo a utilizarse este o no calibrado.
- Factores como temperatura y humedad ambientales.
- Errores debido a la manipulación (analista).

El método clásico para validar un método analítico es me-

dante el análisis de muestras de referencia que son similares en todos los aspectos a las muestras por analizar, ya que se comparan los valores obtenidos con los esperados. Dentro de estas muestras de referencia se encuentran las muestras de placebo cargado, en las cuales a una cantidad de placebo se le adiciona una cantidad conocida de principio activo. La mezcla se analiza y compara con la cantidad adicionada. De acuerdo con este método podemos evaluar los parámetros de validación expresando el resultado en porciento de recobro experimental.

Los resultados obtenidos de la validación generalmente se someten a un análisis estadístico con un nivel de confianza del 95 %. Dicho análisis estadístico incluye cálculos de media, coeficiente de variación, desviación estándar, parámetros de regresión lineal y las pruebas estadísticas de "t" de student y "F".

Es necesario que los métodos analíticos se validen con respecto a una substancia de referencia, que puede ser un estándar primario o secundario. En todo caso estos se emplean para calcular la pureza de la materia prima adicionada al producto, y en base a ello, hacer los cálculos necesarios para obtener los porcentos de recobro reales.

En el caso del presente trabajo, se contó con un estándar secundario de Alantoína al 98 %. Para evaluar la linealidad y precisión del sistema de medición se empleó el estándar directamente. Pero para la validación del método analítico se analizaron placebos cargados con Alantoína materia prima previamente valorada contra Alantoína estándar. De esta manera se calculaban los porcentos de recobro de acuerdo con la pureza de Alantoína materia prima.

La sustancia de referencia empleada debe guardarse en un lugar seco, bien sellado (de preferencia en un desecador) para evitar alteraciones químicas. Generalmente estos se encuentran en frascos viales color ámbar conteniendo un gramo a lo más de la sustancia. Una vez abiertos, las personas que lo utilicen serán responsables de su pureza. Por ello es necesario valorar una materia prima y utilizarla como referencia. Si el estándar no es útil debido a su mal manejo, los resultados y en general el método puede obstaculizarse por una comparación errónea, creando confusiones.

Otro criterio para validación de metodología analítica es el cuidado y mantenimiento del equipo. Para ello se necesita establecer un programa de calibración periódico que asegure el buen funcionamiento del equipo. En nuestro caso para cada determinación se calibraba el electrodo utilizando dos soluciones amortiguadoras una a pH 4 y otra a pH 7.

La medición de parámetros de validación se lleva a cabo mediante mediciones de la cantidad de principio activo utilizando el método propuesto, de tal manera que en cada ensayo se represente la situación más apegada a las condiciones normales de operación.

Indiscutiblemente la validación de metodología analítica no asegura en un cien por ciento la veracidad del análisis. Este deberá realizarse tomando en cuenta todos los factores que pueden alterarlo y de esa manera corregirlos para que los resultados sean satisfactorios. El hecho de que una metodología esté validada, no implica que sea infalible. El analista que emplee dicho



método en su rutina diaria debe concientizarse que si no realiza su trabajo cuidadosamente el método no va a dar resultados satisfactorios por sí mismo.

Por esta razón se necesita crear un plan para abordar un problema analítico que esté dando resultados fuera de límites como el que se enuncia a continuación:

- Tomar en cuenta el número de replicaciones realizadas después de obtener un resultado fuera de límites.
- Revisar cuidadosamente los reactivos utilizados tomando en cuenta sus respectivas fechas de caducidad.
- Si persisten los resultados, revisar entonces las ordenes de fabricación y anotar las posibles anomalías encontradas.
- Si lo anterior está dentro de especificaciones entonces cambiar de analista y comparar resultados.
- Si el segundo analista obtiene resultados fuera de límites, entonces se estudiará nuevamente el método para tratar de encontrar posibles fallas.
- Una vez resuelto este problema se validará nuevamente el método. En caso contrario se desarrollará uno nuevo.

Esto es solo un ejemplo de la importancia que representa la validación en el trabajo diario de la industria. Las demás importancias, a mi juicio, se tendrán que dilucidar ya en el trabajo diario.

#### **IV. PARTE EXPERIMENTAL**

#### IV. PARTE EXPERIMENTAL

##### 1. Antecedentes.

La parte experimental en la cual se basa la técnica analítica fue publicada por D. J. Weber y J. W. Higgins el 12 de diciembre de 1970 en el "Journal of Pharmaceutical Science" bajo el título de "Potentiometric Titration of Allantoin in Cream Formulations".

El método publicado se basa en la separación de Alantoína de los excipientes que constituyen la formulación por medio de una columna cromatográfica empacada con tierra de diatomeas con lavado ácido previamente impregnada con una fase estacionaria. La columna retiene en dicha fase estacionaria al principio activo y los excipientes eluyen al hacer pasar por esta, disolventes como acetato de etilo y éter etílico. Posterior a esta etapa del análisis, se extrae de la columna el principio activo por elución de una cantidad apropiada de agua, la cual es colectada para adicionarle acetona y finalmente titularse potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N. El volumen consumido se relaciona con el peso equivalente de Alantoína, la normalidad de la solución y la cantidad en gramos de muestra para obtener así los miligramos de Alantoína por gramo de crema.

Como los excipientes de la formulación de la suspensión de Alantoína y alquitrán de hulla son en general constituyentes de cremas, se pensó utilizar este método para extraer Alantoína del producto terminado, tomando en cuenta las solubilidades de los excipientes en las fases orgánicas empleadas.

El método requiere para eluir las columnas que, tanto el acetato de etilo y éter etílico, sean previamente saturados con

| Componente<br>(50 mg)                    | Acetato de etilo<br>(10 ml) | Eter etílico<br>(10 ml) | Agua<br>(10 ml) |
|--|-----------------------------|-------------------------|-----------------|
| 1) Metilparabeno                         | Soluble                     | Soluble                 | Poco soluble    |
| 2) Petrolato líquido                     | Insoluble                   | Soluble                 | Insoluble       |
| 3) Monoestearato de<br>polietilen glicol | Insoluble                   | Insoluble               | Insoluble       |
| 4) Alcohol cetílico                      | Soluble                     | Soluble                 | Insoluble       |
| 5) Propilparabeno                        | Soluble                     | Soluble                 | Insoluble       |
| 6) Monoestearato de<br>glicerilo         | Insoluble                   | Insoluble               | Insoluble       |
| 7) Esperma sintética<br>de ballena       | Insoluble                   | Insoluble               | Insoluble       |
| 8) Lauril sulfato de<br>sodio            | Soluble                     | Insoluble               | Soluble         |
| 9) Goma tragacanto                       | Insoluble                   | Insoluble               | Insoluble       |
| 10) Propilenglicol                       | Soluble                     | Soluble                 | Insoluble       |
| 11) Alquitrán de<br>hulla                | Soluble                     | Soluble                 | Insoluble       |
| 12) Alantoína                            | Insoluble                   | Insoluble               | Soluble         |

Como se puede apreciar los componentes que son solubles en las fases orgánicas son los componentes 1, 2, 4, 5, 8, 10 y 11. Esto indica que los componentes 3, 6, 7, 9 y 12 quedan retenidos en la columna.

Posterior a las pruebas de solubilidad, se procedió a realizar la técnica tal y como se expresa en el artículo, utilizando producto terminado. Para este tiempo ya se contaba con una tierra de diatomeas con lavado ácido del proveedor J. T. Baker. El pro-

pósito de esto, fue verificar que los componentes retenidos en la columna no influyeran en la titulación potenciométrica de Alan-tóina, si es que pudieran ser arrastrados por la fase final de agua.

A continuación se detallará la técnica publicada como se explica en el artículo:

a) Reactivos.

Hidróxido de sodio 0.1 N

Acetona grado reactivo

Tierra de diatomeas con lavado ácido

Acetato de etilo saturado con agua

Eter etílico saturado con agua

Fibra de vidrio para las columnas.

b) Aparatos.

Potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio y calomel combinado y un agitador magnético;

Una bureta que adiciona a velocidad constante la solución por medio de un pequeño motor;

Columnas cromatográficas de vidrio de 30 cm de longitud por 2 cm de diámetro interno.

En esta parte se emplea un titulador potenciométrico automático. Como en ese tiempo no se contaba con equipo de esta naturaleza las titulaciones se realizaron utilizando una bureta de 10 ml y un potenciómetro marca Corning modelo pH-Meter 130 equipado con dos electrodos, uno pH triple propósito y otro Ag+/ con ion cloruro interno. Las muestras, mientras ocurre la valoración, se homogenizan con ayuda de un agitador magnético.

d) Preparación de las columnas.

A 4 g de tierra de diatomeas con lavado ácido adicionarle 3.5 ml de fase estacionaria. Dicha fase estacionaria es la fase acuosa que se separa después de la saturación de acetato de etilo.

Este material es adicionado en porciones iguales de 2 cm dentro de la columna, conteniendo una placa de fibra de vidrio al final. La columna es golpeada suavemente en una placa de madera después de cada adición hasta su compactación. Finalmente se empaqueta perfectamente con ayuda de una varilla de vidrio hasta una longitud de 5.6 cm. La columna es lavada con 50 ml de acetato de etilo saturado con agua.

e) Procedimiento.

Pesar adecuadamente una cantidad de la muestra equivalente a aproximadamente 25 mg de Alantoína dentro de un vaso de precipitados de 50 ml, y adicionarle 1.5 g de tierra de diatomeas con lavado ácido. Mezclar perfectamente con una espátula y adicionar 0.5 ml de fase estacionaria, mezclando nuevamente. Adicionar la muestra a la columna previamente preparada y taponar. Colocar un trozo de algodón sobre la muestra y eluir la columna con 100 ml de fase móvil. Cuando el acetato de etilo corra justo sobre la parte superior del empaque adicionar 5 ml de éter etílico saturado con agua. Nuevamente, cuando la fase anterior de éter etílico corra justo encima del empaque, adicionar 25 ml más de éter etílico y dejar secar la columna. Descartar todo el solvente eluido.

Sacar de la columna a la Alantoína por elución de 40 ml de agua desionizada, colectando esta fase en un vaso de precipitados

de 150 ml. Adicionar 70 ml de acetona a los 30-35 ml del eluato colectado y titular potenciométricamente con NaOH 0.1 N, hasta un pH entre 11.5-12.0. Calcular los miligramos de Alantoína por gramo de muestra por sustitución de los valores observados en la siguiente ecuación:

$$\frac{V \times N \times 158.12}{\text{(peso muestra en g)}} = \text{mg de Alantoína / g de muestra}$$

Donde:

V = Volumen consumido por la muestra de NaOH 0.1 N

N = Normalidad de la solución

158.12 = Peso equivalente de Alantoína

Se procedió entonces a realizar una prueba utilizando dos muestras de producto terminado. Según la formulación cada 100 g de suspensión contiene 2 g de Alantoína. Esto implica que el tamaño de muestra a considerar es:

Densidad = 0.9983 g/ml para el producto terminado.

1 ml suspensión ----- 20 mg de Alantoína

x ----- 25 mg de Alantoína

x = 1.25 ml de suspensión

0.9983 g suspensión ----- 1 ml de suspensión

x ----- 1.25 ml de suspensión

x = 1.2521 g de suspensión que contiene 25 mg de Alantoína

Las muestras de suspensión se evaluaron midiendo el pH de la solución acuosa de acuerdo con el volumen de NaOH 0.1 N adicionado y mediante una visualización gráfica se observa el punto de equivalencia.

| Muestra | Peso muestra<br>( g ) | ml<br>consumidos | mg de Alantoína / g<br>de<br>suspensión detectados | % recu-<br>perado |
|---------|-----------------------|------------------|--|-------------------|
| M 1     | 1.2585                | 1.6              | 19.3991  | 97.15             |
| M 2     | 1.2543                | 1.5              | 18.077   | 90.53             |

Estos datos pueden demostrar que el método original puede dar buenos resultados. Pero para evaluar la cantidad de Alantoína con mayor exactitud fue necesario realizar varias pruebas con los componentes del sistema de separación y con el sistema de medición para poder corregir posibles errores.

Primeramente se corrieron tres columnas incluyendo únicamente placebo de la suspensión para detectar posibles interferencias. La cantidad de placebo empleada es la cantidad que teóricamente contiene 25 mg de Alantoína.

| Muestra placebo | peso real ( g ) |
|-----------------|-----------------|
| 1               | 1.2312          |
| 2               | 1.2618          |
| 3               | 1.2653          |

Después de eluir con el método original se titularon las fases acuosas con NaOH 0.1 N. El cálculo del volumen en el punto de inflexión, fue utilizando el criterio de la primera y segunda derivada.



Muestra placebo 1

| V (ml)<br>NaOH 0.0982 | pH   | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-----------------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 0                     | 7.8  |                               |                                   |
| 0.05                  | 8.2  | 8                             | + 280                             |
| 0.10                  | 9.3  | 22                            | + 40                              |
| 0.15                  | 10.5 | 24                            | - 120                             |
| 0.20                  | 11.4 | 18                            | - 160                             |
| 0.25                  | 11.9 | 10                            | - 160                             |
| 0.30                  | 12.0 | 2                             |                                   |

$$V = 0.1 + 0.05 \frac{280}{280 + 160} = 0.13 \text{ ml}$$

Muestra placebo 2

| V (ml)<br>NaOH 0.0982 | pH   | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-----------------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 0                     | 8.4  |                               |                                   |
| 0.05                  | 9.8  | 28                            | + 360                             |
| 0.10                  | 10.3 | 10                            | - 80                              |
| 0.15                  | 11.0 | 14                            | + 40                              |
| 0.20                  | 11.8 | 16                            | - 240                             |
| 0.25                  | 12.0 | 4                             | 0                                 |
| 0.30                  | 12.2 | 4                             |                                   |

$$V = 0 + 0.05 \frac{360}{360 + 240} = 0.03 \text{ ml}$$

Muestra placebo 3

| V (ml)<br>NaOH 0.0982 | pH   | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-----------------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 0                     | 8.5  |                               |                                   |
| 0.05                  | 9.5  | 20                            | - 200                             |
| 0.10                  | 10.0 | 10                            | + 240                             |
| 0.15                  | 11.1 | 22                            | - 240                             |
| 0.20                  | 11.6 | 10                            |                                   |

$$V = 0 + 0.05 \frac{240}{240 + 240} = 0.025 \text{ ml}$$

De la misma manera se corrieron tres soluciones blanco de solventes conteniendo únicamente 40 ml de agua destilada y 70 ml de acetona. Los resultados fueron los siguientes:

**Muestra placebo 3**

| V (ml)<br>NaOH 0.0982 | pH   | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-----------------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 0                     | 8.5  | 20                            |                                   |
| 0.05                  | 9.5  | 10                            | - 200                             |
| 0.10                  | 10.0 | 22                            | + 240                             |
| 0.15                  | 11.1 | 10                            | - 240                             |
| 0.20                  | 11.6 |                               |                                   |

$$V = 0 + 0.05 \frac{240}{240 + 240} = 0.025 \text{ ml}$$

De la misma manera se corrieron tres soluciones blanco de solventes conteniendo únicamente 40 ml de agua destilada y 70 ml de acetona. Los resultados fueron los siguientes:

Muestra blanco 1

| <u>V (ml)</u> | <u>pH</u> | <u><math>\Delta \text{pH} / \Delta V</math></u> | <u><math>\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2</math></u> |
|---------------|-----------|---|---|
| NaOH 0.0982   |           |   |   |
| 0             | 4.7       |   |   |
| 0.05          | 6.9       | 44  | - 360   |
| 0.10          | 8.2       | 26  | + 680   |
| 0.15          | 11.2      | 60  | - 960   |
| 0.20          | 11.8      | 12  | - 80  |
| 0.25          | 12.2      | 8   |   |

$$V = 0.1 + 0.05 \frac{680}{680 + 960} = 0.1210 \text{ ml}$$

Muestra blanco 2

| <u>V (ml)</u> | <u>pH</u> | <u><math>\Delta \text{pH} / \Delta V</math></u> | <u><math>\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2</math></u> |
|---------------|-----------|---|---|
| NaOH 0.0982   |           |   |   |
| 0             | 4.5       |   |   |
| 0.05          | 6.6       | 42  | - 480   |
| 0.10          | 7.5       | 18  | + 1000  |
| 0.15          | 10.9      | 68  | - 1160  |
| 0.20          | 11.4      | 10  | - 40  |
| 0.25          | 11.8      | 8   | - 120   |
| 0.30          | 11.9      | 2   | + 40  |
| 0.35          | 12.1      | 4   |   |

$$V = 0.1 + 0.05 \frac{1000}{1000 + 1160} = 0.1231 \text{ ml}$$

muestra, es decir, entre mayor sea la cantidad de muestra al momento de introducir a la columna, puede derramarse con mayor facilidad alterando los resultados, además de que aumentaría considerablemente la altura final del sistema de separación.

A continuación se muestran los datos obtenidos:

| Muestra | Peso Alantoina<br>( g ) |
|---------|-------------------------|
| -----   | -----                   |
| 1       | 0.0515                  |
| 2       | 0.0512                  |
| 3       | 0.0505                  |

Las valoraciones potenciométricas de las muestras anteriores se mencionan en las siguientes tablas.

Muestra 1

| V (ml) NaOH<br>0.0967 N | pH    | V (ml) NaOH<br>0.0967 N | pH    |
|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| 0                       | 8.90  | 1.80                    | 10.33 |
| 0.05                    | 9.00  | 1.90                    | 10.39 |
| 0.10                    | 9.05  | 2.00                    | 10.45 |
| 0.15                    | 9.07  | 2.10                    | 10.52 |
| 0.20                    | 9.15  | 2.20                    | 10.61 |
| 0.25                    | 9.21  | 2.30                    | 10.68 |
| 0.30                    | 9.28  | 2.40                    | 10.76 |
| 0.40                    | 9.37  | 2.50                    | 10.86 |
| 0.50                    | 9.46  | 2.60                    | 11.00 |
| 0.60                    | 9.63  | 2.65                    | 11.03 |
| 0.70                    | 9.63  | 2.70                    | 11.11 |
| 0.80                    | 9.69  | 2.75                    | 11.20 |
| 0.90                    | 9.75  | 2.80                    | 11.30 |
| 1.00                    | 9.82  | 2.85                    | 11.35 |
| 1.10                    | 9.90  | 2.90                    | 11.47 |
| 1.20                    | 9.96  | 2.95                    | 11.58 |
| 1.30                    | 10.02 | 3.00                    | 11.73 |
| 1.40                    | 10.07 | 3.05                    | 11.81 |
| 1.50                    | 10.13 | 3.10                    | 11.97 |
| 1.60                    | 10.21 | 9.15                    | 12.13 |
| 1.70                    | 10.27 |                         |       |

Los cálculos del volumen de NaOH en el punto de equivalencia

de la tabla anterior fue el siguiente:

Muestra 1

---

| V (ml)      | pH   | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| NaOH 0.0967 |      |                               |                                   |
| 0           | 8.90 |                               |                                   |
| 0.05        | 9.00 | 2.0                           | - 20                              |
| 0.10        | 9.05 | 1.0                           | - 20                              |
| 0.15        | 9.07 | 0.4                           | + 24                              |
| 0.20        | 9.15 | 1.6                           | - 8                               |
| 0.25        | 9.21 | 1.2                           | + 4                               |
| 0.30        | 9.28 | 1.4                           |                                   |

$$V = 0 + 0.05 \frac{24}{24 + 20} = 0.027 \text{ ml}$$

| V (ml)      | pH    | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-------------|-------|-------------------------------|-----------------------------------|
| NaOH 0.0967 |       |                               |                                   |
| 2.90        | 11.47 |                               |                                   |
| 2.95        | 11.58 | 2.4                           | + 16                              |
| 3.00        | 11.73 | 2.2                           | - 28                              |
| 3.05        | 11.81 | 3.0                           | + 32                              |
| 3.10        | 11.97 | 1.6                           | 0                                 |
| 3.15        | 12.13 | 3.2                           |                                   |

$$V = 3.05 + 0.05 \frac{32}{32 + 28} = 3.08 \text{ ml}$$

Cálculos muestra 1:

$$V_t = 0.027 \text{ ml} + 3.08 \text{ ml} = 3.097 \text{ ml}$$

$$\text{mg de Alantoína} = 3.097 \text{ ml} \times 0.0967 \text{ meq/ml} \times 158.12 \text{ mg/meq}$$

mg de Alantoína = 47.5 mg

La pureza de la materia prima empleada, que fue obtenida del certificado de análisis del proveedor, es de 96.69 %. Por lo tanto se tomará este valor para el cálculo del porcentaje detectado por el método.

96.69 mg Alantoína ----- 100 mg polvo

X ----- 51.5 mg

X = 49.8 mg Alantoína

49.8 mg Alantoína ----- 100 %

47.5 mg Alantoína ----- X

X = 95.38 % de recobro



Muestra 2

| V (ml)      | pH   | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| NaOH 0.0967 |      |                               |                                   |
| 0           | 8.86 |                               |                                   |
| 0.05        | 8.93 | 1.4                           | + 20                              |
| 0.10        | 9.05 | 2.4                           | - 40                              |
| 0.15        | 9.07 | 0.4                           | + 20                              |
| 0.20        | 9.14 | 1.4                           |                                   |

$$V = 0.05 + 0.05 \frac{20}{20 + 40} = 0.067 \text{ ml}$$

| V (ml)      | pH    | pH / V | pH / V |
|-------------|-------|--------|--------|
| NaOH 0.0967 |       |        |        |
| 3.00        | 11.30 |        |        |
| 3.05        | 11.42 | 2.4    | - 20   |
| 3.10        | 11.49 | 1.4    | + 28   |
| 3.15        | 11.63 | 2.8    | - 4    |
| 3.20        | 11.76 | 2.6    | + 40   |
| 3.25        | 11.99 | 4.6    | - 44   |
| 3.30        | 12.11 | 2.4    |        |

$$V = 3.20 + 0.05 \frac{40}{40 + 44} = 3.224 \text{ ml}$$

Cálculos muestra 2:

$$V_t = 0.083 \text{ ml} + 3.224 \text{ ml} = 3.307 \text{ ml}$$

$$\text{mg de Alantoina} = 3.307 \text{ ml} \times 0.0967 \text{ meq/ml} \times 158.12 \text{ mg/meq}$$

$$\text{mg de Alantoina} = 50.6 \text{ mg}$$

Si la pureza de la materia prima es de 96.69 % tenemos:

96.69 mg Alantoína ----- 100 mg polvo

X ----- 51.2 mg

X = 49.5 mg Alantoína

49.5 mg Alantoína ----- 100 %

50.6 mg Alantoína ----- X

X = 102.22 % de recobro

Muestra 3

| V (ml)      | pH   | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| NaOH 0.0967 |      |                               |                                   |
| 0           | 8.63 |                               |                                   |
| 0.05        | 8.74 | 2.4                           | - 4                               |
| 0.10        | 8.84 | 1.8                           | - 16                              |
| 0.15        | 8.90 | 1.2                           | - 4                               |
| 0.20        | 8.95 | 1                             | + 4                               |
| 0.25        | 9.01 | 1.2                           |                                   |

$$V = 0 + 0.05 \frac{4}{4 + 16} = 0.010 \text{ ml}$$

| V (ml)<br>NaOH 0.0967 | pH    | $\Delta \text{pH} / \Delta V$ | $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ |
|-----------------------|-------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 3.00                  | 11.38 |                               |                                   |
| 3.05                  | 11.46 | 1.6                           | + 36                              |
| 3.10                  | 11.63 | 3.4                           | - 28                              |
| 3.15                  | 11.73 | 2.0                           | - 12                              |
| 3.20                  | 11.80 | 1.4                           | + 16                              |
| 3.25                  | 11.91 | 2.2                           | + 4                               |
| 3.30                  | 12.03 | 2.4                           |                                   |

$$V = 3.05 + 0.05 \frac{36}{36 + 28} = 3.08 \text{ ml}$$

Cálculos muestra 3:

$$V_t = 0.010 \text{ ml} + 3.08 \text{ ml} = 3.090 \text{ ml}$$

$$\text{mg de Alantoína} = 3.090 \text{ ml} \times 0.0967 \text{ meq/ml} \times 158.12 \text{ mg/meq}$$

$$\text{mg de Alantoína} = 47.3 \text{ mg}$$

Considerando la valoración de la materia prima, entonces:

$$96.69 \text{ mg Alantoína} \text{ ----- } 100\text{mg polvo}$$

$$X \text{ ----- } 50.5 \text{ mg}$$

$$X = 48.8 \text{ mg Alantoína}$$

$$48.8 \text{ mg Alantoína} \text{ ----- } 100 \%$$

$$47.3 \text{ mg Alantoína} \text{ ----- } X$$

$$X = 96.93 \% \text{ de recobro}$$

Como se puede observar los porcentos de recobro obtenidos varían considerablemente. Esto dio pie a una serie de adaptaciones al método ya establecido, que mejorarán las condiciones de

separación.

Las adaptaciones realizadas fueron de acuerdo con los recursos existentes. Esto es por ejemplo, a que no se utilizó la tierra de diatomeas que especifica el artículo, sino que se empleó el sustituto que se mencionó en la técnica y que funcionó adecuadamente.

Además en esta etapa, la compañía adquirió un titulador potenciométrico automático marca Mettler modelo DL 25, que suplió las funciones que venían llevándose a cabo hasta este momento, con el potenciómetro y la bureta.

En las páginas subsecuentes se mencionarán las adaptaciones realizadas al método con más detalle, en los aspectos que son fundamentales para la determinación de Alantoína.

## 2. Adaptación de la Técnica Analítica al Producto.

### a) Cantidad de Empaque.

Como se mencionó en el capítulo III referente a generalidades, específicamente en la parte de cromatografía de partición (CLL), el empaque dentro de una columna constituye la fase de gran área superficial que, en conjunto con la fase estacionaria, aseguran una transferencia de soluto al paso del eluyente adecuado.

Por esta razón y, considerando que aunque este soporte empleado en la técnica debe ser inerte y no actuar químicamente con los componentes de la suspensión, representa la clave fundamental en el sistema cromatográfico de separación, debido a que sobre esta tierra de diatomeas se dispone en capa delgada la fase estacionaria efectiva que retiene a la Alantoína separándola del resto de los excipientes de la formulación.

Además, las propiedades físicas de este soporte, como tamaño de partícula, densidad aparente y compactabilidad principalmente, son determinantes para el manejo tanto de la muestra como en el empaçado de la columna. En el artículo no se mencionan estos parámetros, únicamente se menciona el nombre comercial del soporte y, en consecuencia, la cantidad de empaque y la altura de este dentro de la columna son específicos para el tipo de empaque mencionado.

Fundamentalmente la adaptación concerniente a la cantidad de empaque, fue realizada en los aspectos anteriormente mencionados. Inicialmente se trató de conseguir la misma altura mencionada en el artículo, pero la relación de peso disminuyó. Esto quiere de-

cir que el soporte utilizado es mucho menos denso que el reportado para Celite 545. Por lo tanto esto implica que el área superficial disminuye aún cuando haya una diferencia relativamente grande en tamaño de partícula y densidad.

Por lo tanto, como se creó la necesidad de aumentar el tamaño de la muestra debido a que la sensibilidad de la balanza es de 50 mg, se consideró pesar la misma cantidad especificada, que es de 4 g, aún cuando la altura final aumentara. El incremento en la altura del soporte, utilizando tierra de diatomeas J. T. Baker (filtro ayuda para análisis), fue entre 0.6 y 0.8 cm. Así la altura que se consiguió fue entre 6.0 y 6.2 cm.

Esto, en consecuencia, aumenta el área superficial de contacto del soporte con la muestra, consiguiéndose una mayor retención de Alantoína representando una ventaja dada las nuevas condiciones de la muestra.

Los porcentajes de recobro obtenidos con una cantidad menor de empaque y con la altura reportada en el artículo son variables, es decir, que fluctúan entre 68 y 75 % ratificandose así que la disminución del área es fundamental para la separación. A continuación se muestran los datos obtenidos:

| Muestra | V (ml)<br>NaOH 0.1 N | Cantidad<br>adicionada<br>(mg) | Cantidad<br>recuperada<br>(mg) | % de<br>recobro |
|---------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1       | 2.35                 | 52.60                          | 35.93                          | 68              |
| 2       | 2.48                 | 54.40                          | 39.23                          | 72              |
| 3       | 2.51                 | 52.90                          | 39.69                          | 75              |
| 4       | 2.39                 | 53.98                          | 37.79                          | 70              |
| 5       | 2.43                 | 56.09                          | 38.42                          | 68              |

Al final de la descripción de estas adaptaciones, se mostrarán los resultados obtenidos así como la técnica definitiva para la cuantificación de Alantoina en la suspensión.

b) Empacado de la Columna.

También en el capítulo de cromatografía de partición, se mencionan las diferentes maneras de empacado. La forma utilizada en el artículo indica que una vez teniendo la cantidad de empaque, debe ser impregnada con la fase estacionaria, mezclando con espátula hasta tener una consistencia homogénea. La consistencia obtenida utilizando este empaque no es la de una pasta como se podría pensar, dada la naturaleza de la fase estacionaria, sino la de un sólido húmedo que aumenta su compactabilidad.

El artículo especifica adicionarlo a la columna en porciones de 2 cm. Esto, para el tipo de empaque utilizado, no se consideró así, debido a que no se obtiene la misma altura con el soporte empleado por las razones especificadas en el punto anterior. Pero en sustitución a este detalle, se adoptó el criterio de adicionar el soporte en porciones iguales, específicamente pequeñas, pero siempre iguales, y compactar cada una de estas por golpeteo suave

sobre una placa de madera, hasta observar que la superficie y los costados tengan una consistencia lo más uniforme posible, libre de burbujas de aire.

Las pruebas iniciales presentaron dificultades en cuanto a empaçado, debido a que se trató de compactar utilizando vibraciones. Dada la condición de humedad adquirida al incorporar la fase estacionaria, no se conseguía una buena compactación con dichas vibraciones. En consecuencia los resultados variaron considerablemente en un 60 % de recobro aproximadamente.

| Muestra | V (ml)<br>NaOH 0.1 N | Cantidad<br>adicionada<br>(mg) | Cantidad<br>recuperada<br>(mg) | % de<br>recobro |
|---------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1       | 1.88                 | 51.20                          | 29.70                          | 58              |
| 2       | 1.94                 | 51.20                          | 30.70                          | 60              |
| 3       | 1.98                 | 53.00                          | 31.30                          | 59              |
| 4       | 2.04                 | 53.00                          | 32.30                          | 61              |
| 5       | 2.01                 | 51.30                          | 31.80                          | 62              |

Entonces, se trató de compactar el empaque dentro de la columna, golpeando suavemente sobre una placa de madera. Por este método se trató de estandarizar el número de golpes necesarios para conseguir una uniformidad tal, que permitiera una buena separación de Alantoína.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, pero fueron mejores que los anteriores, demostrando que también la uniformidad de compactación determina el grado de separación y, en consecuencia, el porcentaje de recobro obtenido.

En cuanto a la estandarización del número de golpeteos para



conseguir una uniformidad adecuada, se puede decir que este es un parámetro variable que depende de la persona que lleva a cabo el análisis, debido a que cada persona no puede igualar la intensidad que le da a cada golpe durante el empaqueo. Lo mismo sucede para una persona, cuyo golpeteo no es nunca uniforme pero es mucho más constante. Por lo tanto se puede decir que el criterio a adoptar es el golpeteo "suave", entendiéndose por esto, que cada golpe debe ser de una intensidad tal, que evite la fractura del empaque, o bien, que no permita una soltura de las partículas para evitar así: la formación de canales de aire o burbujas, factores que alteran la fase de separación del método.

Los resultados obtenidos hasta esta etapa del trabajo experimental, utilizando los criterios de las dos adaptaciones realizadas, demuestran un mejoramiento en la etapa de mejoración y cuantificación de Alantoina, mismos que se expresan a continuación:

| Muestra | V (ml)<br>NaOH 0.1 N | Cantidad<br>adicionada<br>(mg) | Cantidad<br>recuperada<br>(mg) | % de<br>recobro |
|---------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1       | 2.80                 | 50.50                          | 46.00                          | 92.9            |
| 2       | 2.80                 | 50.20                          | 46.10                          | 93.7            |
| 3       | 2.81                 | 50.70                          | 46.20                          | 92.9            |
| 4       | 2.85                 | 51.70                          | 47.00                          | 92.2            |
| 5       | 2.85                 | 51.50                          | 47.00                          | 93.1            |

De este modo se puede decir que las adaptaciones realizadas hasta este momento, en combinación con las optimizaciones adecuadas puede mejorar los porcentajes de recobro.

Otro aspecto importante dentro del empaqueo es la compactación final realizada con ayuda de una varilla de vidrio. Una vez

empacada dentro de la columna, la tierra de diatomeas que queda en la superficie es compactada utilizando una suave presión con el lado plano de la varilla. Sobre esta tierra así empacada se deposita la muestra que esta mezclada con una porción de 2 g de la misma tierra y se empaqueta de la misma manera que el empaque.

c) Preparación y Tamaño de la Muestra.

Como se mencionó en puntos anteriores, la modificación al tamaño de la muestra fue uno de los factores determinantes para realizar las adaptaciones al método original.

Esta consistió en aumentar la cantidad por determinar, debido a la precisión de la balanza utilizada en la preparación de las muestras.

En cuanto a lo que se refiere a la preparación de las muestras, fue necesario fabricar un lote de placebo de la suspensión conteniendo todos los ingredientes menos Alantoína. Dicho placebo fue preparado de acuerdo con el proceso de manufactura que se lleva a cabo en el área de producción. El resultado fue que el placebo, aunque se tuvo cuidado de mantener las condiciones de temperatura y agitación, presentó una viscosidad muy alta y un aspecto diferente al producto terminado.

Por esta razón se pidió al área de líquidos que de un lote de producción normal, se tomaran 500 gr de producto en proceso antes de adicionarle Alantoína. Esto fue posible debido a que la inclusión del principio activo para la suspensión es en el último paso de manufactura, el cual consiste en dispersar Alantoína en propileno glicol y adicionarse cuando la mezcla principal esté a 40 °C.

Las características físicas de esta mezcla son muy similares al producto terminado, de tal manera que es válido utilizarse como placebo.

En general las muestras fueron preparadas pesando adecuadamente 50 mg de Alantoína, a las cuales se les adicionó 2.5 g de placebo. Esta mezcla se incorporó con una espátula hasta una apariencia uniforme. El artículo especifica que, para la preparación de las muestras que van a someterse a análisis, dicho placebo mezclado con el principio activo, debe calentarse. Se considera, en este caso específicamente que no es necesario el calentamiento, dado que la naturaleza de la forma farmacéutica es que Alantoína no va a incorporarse al placebo, sino que permanecerá en suspensión.

Por lo tanto, una vez incorporada la mezcla dentro de frascos color ámbar sellados con parafilm, permanecerán en reposo cuatro días antes del análisis.

Posteriormente a estos placebos cargados se les adicionó 2.0 g de tierra de diatomeas con lavado ácido y 0.8 ml de fase estacionaria, mezclando con una espátula hasta una apariencia uniforme. La muestra, así preparada, se adiciona dentro de columnas preparadas de acuerdo a las adaptaciones mencionadas anteriormente.

Creo que es importante mencionar que la consistencia de la tierra de diatomeas que está incorporada con la muestra presenta ciertas características que impiden empacarla dentro de la columna como el empaque previo. Esto es debido, a que las características de los excipientes, que en su mayoría son grasas, confieren a dicha tierra una consistencia grasosa, lo cual provoca una

aglutinación de esta y en consecuencia dificultad de manejo.

Para efectos del análisis, es necesario empacar la muestra dentro de la columna lo más uniformemente posible. Esto con mucho cuidado puede llegar a realizarse, pero si no, puede considerarse no tan importante ya que el empaque, tanto el de la columna como el de la muestra, se encargan de retener Alantoina y si el empaque de la muestra no queda uniforme, no se altera considerablemente el resultado final.

Una prueba de ello lo demuestran los siguientes resultados:

| Muestra | V (ml)<br>NaOH 0.1 N | Cantidad<br>adicionada<br>(mg) | Cantidad<br>recuperada<br>(mg) | % de<br>recobro |
|---------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1       | 3.0335               | 52.70                          | 49.90                          | 94.7            |
| 2       | 2.9478               | 51.10                          | 48.50                          | 94.9            |
| 3       | 2.8667               | 50.20                          | 47.20                          | 94.0            |
| 4       | 2.8898               | 52.00                          | 47.60                          | 91.5            |
| 5       | 2.8011               | 49.20                          | 46.10                          | 93.7            |

Para estos resultados la apariencia del empaque que contenía la muestra dentro de la columna, no era uniforme del todo, pero los resultados no variaron mucho con respecto a los anteriores.

Como se podrá notar, la cantidad de fase estacionaria adicionada, tanto a la muestra como al empaque, no variaron considerablemente. Esto puede conducir a que, como se aumentó el tamaño de la muestra, Alantoina no es retenida en su totalidad. Esto es lógico, sin embargo no sucede así ya que los resultados lo expresan. Una de las causas que impidieron el aumento de la fase esta-

cionaria es debido a que se dificultó el manejo de la tierra de diatomeas al momento de empacarla, pues esta adquiriría un grado de humectación tal, que forma aglutinaciones y en consecuencia una mala distribución del área superficial.

Por otro lado se encuentra la relación de solubilidad de Alantoína en agua. Si Alantoína es soluble, 1 g en 190 ml de agua, los 50 mg teóricamente contenidos en los 2.5 g de muestra son solubles en 9.5 ml de agua. Esto se trató de mejorar como se explicará en el siguiente punto. Por esto la cantidad de agua de la fase estacionaria solo retiene a Alantoína y de ninguna manera ésta sale de la columna con el acetato de etilo ni con el éter.

#### d) Forma de Elución.

Originalmente, Alantoína es extraída de la columna, por medio de una porción de agua deionizada, colectando los mililitros eluidos y desechando todos los solventes orgánicos. Como Alantoína es poco soluble en agua, según la literatura y las pruebas de solubilidad realizadas, se trató de encontrar una manera de obtener un porcentaje mayor de recobro.

Si Alantoína es poco soluble en agua a temperatura ambiente y muy soluble en agua caliente, se consideró entonces la posibilidad de utilizar la misma cantidad de agua pero en caliente.

Esto creó, en un principio ciertas dificultades, debido a que el empaque estaba humedecido con éter, y al momento de introducir el agua caliente se producían proyecciones, incluso del empaque, debido a la ebullición violenta del éter.

Tratando de secar el empaque antes de adicionar agua caliente, se producía fracturas de este y en consecuencia se realizaba

una separación defectuosa, ya que se forman canales de aire, con lo cual, partes del sistema de separación no eran eluidas por dicha fase acuosa dando porcentajes de recobro bajos.

Por lo tanto se decidió dividir la cantidad de agua en dos partes: una de 20 ml a temperatura ambiente, que se adiciona inicialmente para impregnar la columna y otra de 40 ml a 50 °C que arrastre la mayor parte del principio activo. Ambas partes de agua tienen en común, la finalidad de extraer el principio activo de la columna, solo que una en mayor cantidad que la otra. De esta manera los porcentajes de recobro aumentaron considerablemente como se aprecia en la siguiente tabla:

| Muestra | V (ml)<br>NaOH 0.1 N | Cantidad<br>adicionada<br>(mg) | Cantidad<br>recuperada<br>(mg) | % de<br>recobro |
|---------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1       | 3.1230               | 48.34                          | 47.75                          | 98.77           |
| 2       | 3.0735               | 48.34                          | 46.99                          | 97.20           |
| 3       | 3.2313               | 48.35                          | 49.41                          | 102.20          |
| 4       | 3.2371               | 48.34                          | 49.50                          | 102.39          |
| 5       | 3.0046               | 48.34                          | 49.94                          | 103.30          |

Con la inclusión del solvente final a una temperatura mayor a la realizada anteriormente, podría pensarse que, además de Alantoína, puede eluir alguna de las sustancias que se solubilizan en agua a 50 °C como metilparabeno, propilparabeno y lauril sulfato de sodio. Sin embargo, la mayor parte de éstas son eluidas por el acetato de etilo y el éter, y si alguna cantidad pudiera pasar, la incorporación de acetona a la fase final, provoca un corrimiento del pKa de Alantoína. Esto se comprobó dado a que

después de la titulación de las muestras se graficaron los valores obtenidos. La gráfica resultante, presenta un punto de inflexión similar a un estándar de Alantoina titulado de la misma manera.

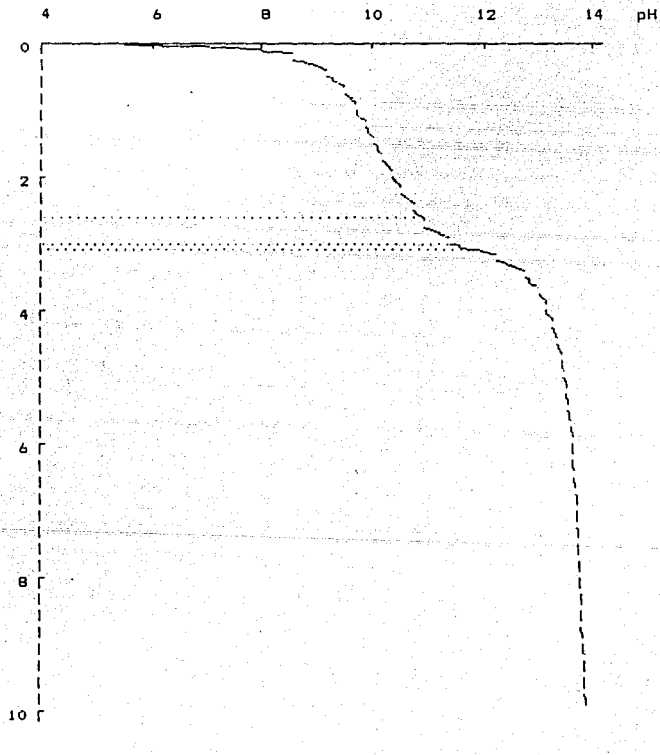
Esto puede representar, en cierta forma, una identificación de Alantoina para el sistema de separación propuesto, y proporcionar una idea del comportamiento durante la titulación. Las gráficas que demuestran lo anterior, fueron obtenidas utilizando la impresora matricial del titulador potenciométrico automático, las cuales se presentan a continuación:

# TITRATION

3

METHOD  
IDENT  
CONC mol/L  
CONST

prov 1  
.10810  
1.0000





TITRATION

9

METHOD

3

IDENT

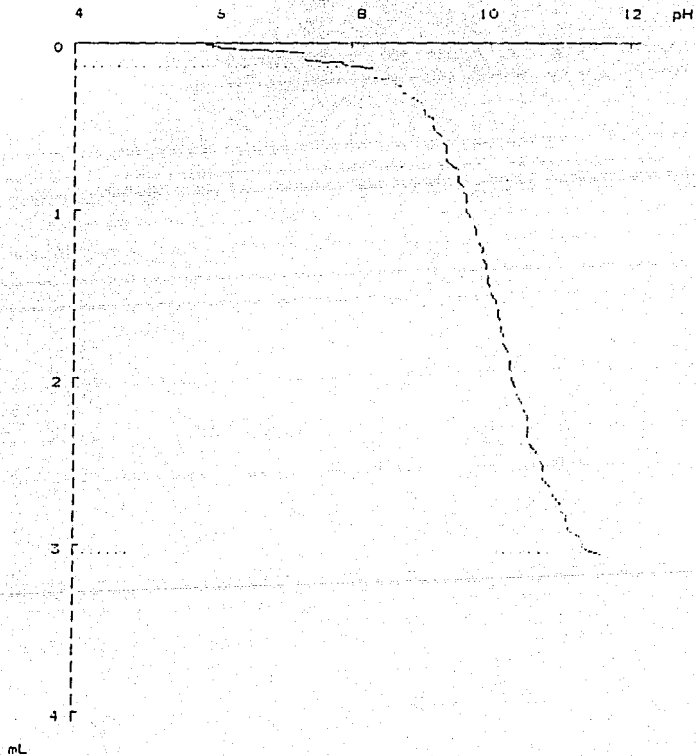
100.3

CONC mol/L

.10810

const

1.0000



#### e) Titulación Potenciométrica de las Muestras.

La valoración final de Alantoína es realizada adicionando a los eluatos colectados, una porción de acetona que representa el 66 % en la mezcla final. Para los 60 ml que normalmente son colectados, se adicionan 116 ml de acetona grado reactivo para después llevar a cabo su titulación con hidróxido de sodio 0.1 N.

La titulación de las muestras eluidas de la columna fue realizada utilizando el titulador potenciométrico automático marca Mettler modelo DL 25, el cual consta de 12 módulos de programación. Con cada uno de ellos se pueden crear programas de titulación de acuerdo con la naturaleza química de la sustancia. Estos pasos en conjunto se denominan configuración.

El primer paso en la configuración, denominado "TIPE", indica el tipo de valoración que se llevará a cabo. En este paso el número 9010 indica un tipo de valoración especial que presenta dos puntos de equivalencia, y que los valores en la pantalla sean de pH.

El segundo paso denominado "CONTROL", indica la velocidad en mv/seg con la cual se dan los cambios de potencial a lo largo de la valoración. Este parámetro dá como valor estandar el número 2, cuya velocidad de cambio potencial es de 0.5 mv/seg.

El tercer paso "PREDOSING", indica los elementos de volumen adicionado a lo largo de la valoración. Se tomó como criterio la adición de 0.05 ml, dado a que los puntos de equivalencia son pequeños, y si aumentara la cantidad de valorante, no se apreciaría cambio alguno en el potencial.

"BUR/MAX VOL", indica la capacidad de la bureta y el volumen máximo que pueda consumir la muestra. Se mencionó la capacidad de

la bureta, debido a que la adición de la solución valorante, es mediante un émbolo que, de acuerdo al diámetro de la bureta, asciende una cierta longitud. Es por esto que para una bureta de 20 ml, que tiene un diámetro mayor con respecto a una de 10 ml (valor estándar proporcionado por el aparato), el valor clave es 1 y los siguientes tres dígitos de izquierda a derecha, representan el volumen que puede ser de 1 a 999 ml. Por lo tanto el valor 1010 indica la utilización de una bureta de 20 ml y un volumen máximo de dosificación de 10 ml.

El paso de configuración número 5, se utiliza en aquellos casos en los que se conoce el pH donde exactamente se presenta el punto de inflexión. En este caso, como se especifica en el artículo, no se conoce con exactitud en que pH está situado dicho punto, solo se da un rango en donde se presenta el cambio brusco de potencial. Para el método propuesto, no se consideró este paso de configuración.

"STIR TIME" representa el tiempo de agitación previo a la titulación, el cual debe ser introducido en segundos. Para nuestras muestras, basta con 5 segundos de agitación antes de titular.

El séptimo paso denominado "OUT PUT", indica en que unidades se dará el resultado y los pH iniciales en cada titulación. Para la clave 920 el resultado está dado en ml e indicando los pH iniciales con una precisión de décimas.

En "SISTEM", se le indica al titulador si hay otros sistemas acoplados a este, como pueden ser una balanza analítica, una impresora u otro titulador, entre otros sistemas. En este caso la

===== METTLER DL25 Titrator date 02-01-90 =====

METHOD 3  
date 24-10-89

|       |       |         |
|-------|-------|---------|
| conc  | mol/L | .11570  |
| modst | reag  | .20420  |
| blank | mL    | .00000  |
| blank | mL    | .00000  |
| modst |       | 1.00000 |

CONFIGURATION VI.0

|   |            |      |
|---|------------|------|
| 1 | TYPE       | 7010 |
| 2 | CONTROL    | 2    |
| 3 | PREDOS     | .05  |
| 4 | BUR/MAXVOL | 1010 |
| 5 |            | 0    |
| 6 | STIR TIME  | 15   |
| 7 | OUTPUT     | 720  |
| 8 | SYSTEM     | 1    |
| 9 |            | 0    |
| 0 |            | 0    |
| 0 |            | 0    |

|     |      |        |
|-----|------|--------|
| PHO | PH   | 6.874  |
| EMF | OP   | -58.5  |
| TV  | low  | 16.000 |
|     | high | 12.000 |

clave 1 indica que al titulador se le acopló una impresora matricial.

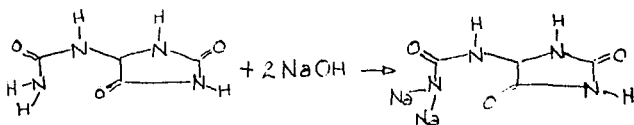
Inicialmente, cuando se realizaban pruebas con el método propuesto, se llevaba a cabo la determinación de Alantoína utilizando una bureta de 10 ml y se adicionaba la solución de Hidróxido de sodio 0.1 N en incrementos de 0.05 ml. (Gráficas 1 y 2).

Como se puede apreciar, el comportamiento obtenido experimentalmente es muy semejante al reportado en el artículo, utilizando una solución acuosa de Alantoína, con una proporción de 66% acetona-agua.

Ahora bien, esta determinación se realizó al eluato colectado después de la separación cromatográfica. (Gráfica 3).

De esta manera se puede decir que, el método propuesto, es capaz de detectar Alantoína, previa separación cromatográfica de la forma farmacéutica, sin interferencia alguna, dado al desarrollo de la reacción en presencia de Hidróxido de sodio.

Se puede decir entonces, que la reacción verificada al momento de la titulación es la siguiente:



en donde los iones  $H^+$  de la amina primaria, son susceptibles de reaccionar con los iones  $OH^-$  del Hidróxido de sodio, acentuándose este carácter con la adición de acetona al momento de la

titulación, de tal manera que se detectan dos punto de equivalencia, mismos que corresponden a los iones  $H^+$  de la amina.

TITULACION POTENCIOMETRICA  
DE ALANTOINA STD.

STD 1

CONC. SOL = 0.828 mg/ml  
ALICUOTA = 30ml.  
GRAFICA 1

meq.  
NaOH

0.20

0.15

0.1

0.05

12

11

10

9

8

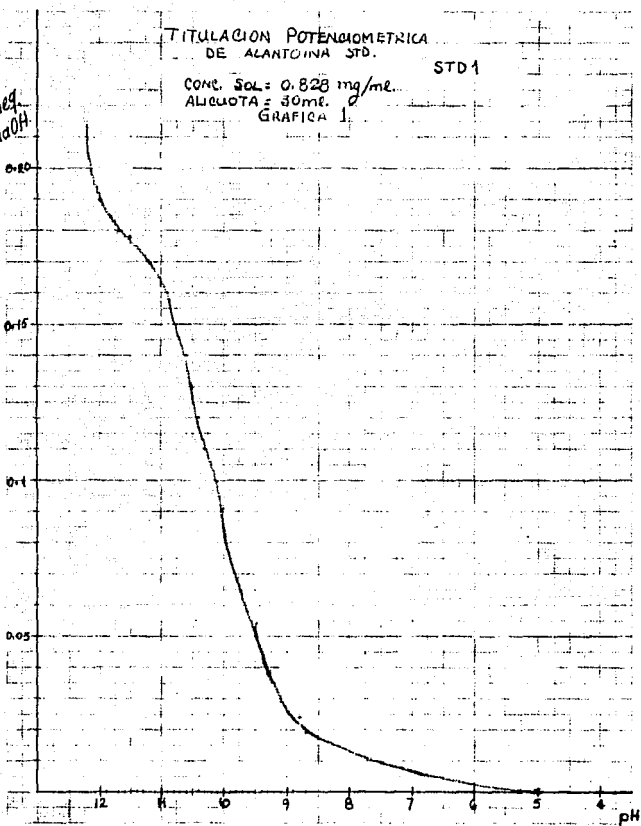
7

6

5

4

pH

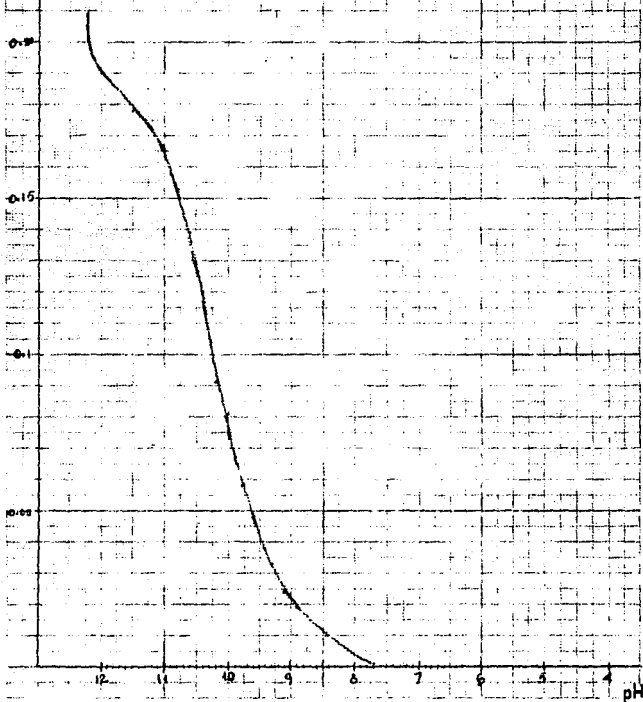


TITULACION POTENCIOMETRICA  
DE ALANTOINA STD.

CONC. SOL. = 0.828 mg/ml.  
ALICUOTA = 30ml.  
GRAFICA 2

STD 2

meq.  
NaOH

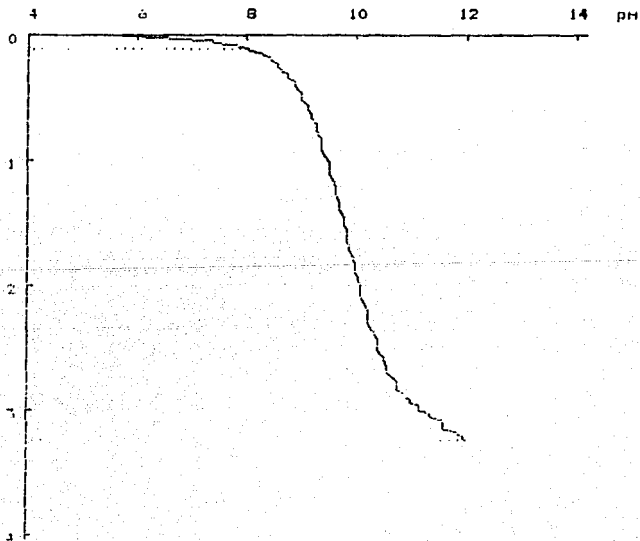




METTLER DL25 Titrator date 03-10-89

|              |        |                    |
|--------------|--------|--------------------|
| TITRATION    | 10     | operator           |
| METHOD       | 3      | 9010               |
| IDENT        | 3      | Remarks 2 03-10-89 |
| CONC mol/L   | .10670 |                    |
| CONST        | 1.0000 |                    |
| START pH     | 5.706  |                    |
| RESULT ml    | .10505 |                    |
| HNV pH       | 7.378  |                    |
| R low pH mL  | .10505 |                    |
| RESULT mL    | 3.1416 |                    |
| HNV pH       | 9.850  |                    |
| R high pH mL | 3.1416 |                    |

|            |        |
|------------|--------|
| TITRATION  | 10     |
| METHOD     | 3      |
| IDENT      | 3      |
| CONC mol/L | .10670 |
| CONST      | 1.0000 |



**V. VALIDACION DEL METODO  
ANALITICO**

## V. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

### 1. Técnica Analítica.

#### a) Equipo:

- Titulador potenciométrico automático marca Mettler DL 25 equipado con: electrodo de vidrio combinado universal marca Mettler DG 111 para titulaciones ácido-base, propela agitadora, bureta intercambiable de 20 ml marca Mettler DV 420 manguera dosificadora con punta de bureta que inyecta a velocidad constante.
- Columnas cromatográficas de vidrio boro-silicato de 30 cm de longitud por 2 cm de diámetro interno, con placa porosa de filtración rápida, colocada al fondo de estas.

#### b) Reactivos:

- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N estandarizada potenciométricamente contra un patrón primario de biftalato de potasio.
- Acetona grado reactivo.
- Tierra de diatomeas con lavado ácido (filtro analítico), marca J.T. Baker No. de catálogo 1939.
- Acetato de etilo grado reactivo.
- Eter etílico grado reactivo,
- Alantoina estándar secundario de referencia del catálogo Aldrich Chemical No. A2 839-2, Pureza: 98 %.
- Alantoina materia prima lote ABSA No. A80615 (Vitadrog S. A. de C.V.).
- Placebo de la suspensión dérmica.

#### c) Preparación de Solventes:

- Acetato de etilo saturado con agua: 200 ml de acetato de etilo R.A. y 20 ml de agua se mezclan en un embudo de separación, agitando hasta la saturación completa. Cuando se equilibran las fases, separar la fase acuosa (inferior) que servirá como fase estacionaria en la columna y para la preparación de las muestras. La fase de acetato de etilo es la fase orgánica móvil para la elución de la columna.
- Éter etílico saturado con agua: se prepara adicionando 25 ml de agua a 100 ml de éter etílico contenido en un embudo de separación. Agitar hasta completar la saturación. Una vez equilibradas las fases separar la fase acuosa (inferior), descartándola. El éter es empleado para la elución de la columna.

d) Preparación de la Columna:

A 4.0 g de tierra de diatomeas con lavado ácido (filtro analítico), se le adicionan 3.6 ml de fase estacionaria, mezclando con una espátula. Este material es adicionado en porciones de 2 cm aproximadamente a una columna cromatográfica que contiene una placa porosa en el fondo. La columna se golpea contra una placa de madera hasta que tenga un aspecto uniforme, desde una altura aproximadamente de 3 cm. Compactar perfectamente el soporte dentro de la columna con una varilla de vidrio a una longitud entre 6.0 y 6.5 cm. Lavar con 50 ml de acetato de etilo saturado con agua. La columna queda lista para ser usada.

e) Procedimiento General para la Preparación de Placebos Cargados:

Se prepara un lote placebo de la suspensión conteniendo to-

dos los ingredientes menos Alantoína. Se pesan las cantidades necesarias de principio activo para cada determinación y se les adiciona 2.5 g de placebo mezclando con una espátula, dentro de frascos ámbar. Tapar cada uno con parafilm y dejar reposar durante 4 días antes del análisis a temperatura ambiente y en un lugar fresco y seco, para evitar la evaporación de la mestra.

f) Procedimiento:

Pesar aproximadamente una cantidad de suspensión equivalente a 50 mg de Alantoína dentro de un vaso de precipitados de 100 ml y adicionar 2.0 g de tierra de diatomeas con lavado ácido (filtro analítico). Mezclar completamente con una espátula y después adicionar 0.8 ml de fase estacionaria mezclando nuevamente. La muestra así preparada, se adiciona a una columna previamente empacada y lavada. La muestra se adiciona de la misma manera que la adición del soporte y se compacta nuevamente hasta una altura de 8-8.5 cm. Eluir la columna con 140 ml de acetato de etilo saturado con agua (fase móvil) en porciones de 40: 50: 50 ml. Cuando la fase orgánica corra justo en la superficie del soporte, adicionar 5ml de éter etílico saturado con agua, y nuevamente cuando la fase de éter etílico corra justo en la superficie, adicionar 35 ml más de éter etílico saturado con agua dejando eluir totalmente. Descartar todo el disolvente eluido. La Alantoína se extrae de la columna por elución de 60 ml de agua deionizada de la siguiente manera: adicionar primero 20 ml de agua deionizada a 30 °C para evitar proyección por los residuos de éter acumulados en la columna y para impregnar el soporte. Los 40 ml de agua restantes se adicionan a 50 °C, dejando eluir hasta sequedad. Colectar la fase acuosa en un vaso de precipitados de 250 ml, hasta

que la columna seque. Para esto se puede ayudar pasando aire por encima del soporte con una perilla cuidadosamente para evitar romper el soporte. Adicionar a la fase acuosa colectada 116 ml de acetona (proporción final: 66 % acetona-agua) y titular potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N, hasta un pH de 11.5 a 12.0. Calcular los mg de Alantoína por gramo de muestra por sustitución de los valores obtenidos en la siguiente expresión:

$$\frac{V \times F \times 158.12 \times 100}{1000 \text{ (peso muestra g)}} = \text{mg Alantoína/g de suspensión}$$

Donde:

V = ml de NaOH 0.1 N consumidos

F = Factor de Normalidad de la solución titulante

158.12 = Peso equivalente de Alantoína (mg/meq)

Cada determinación realizarse por triplicado contra una muestra estandar preparada de la misma manera (sin excipientes).

## 2. Parámetros Evaluados para la Validación.

El método analítico propuesto se sometió a un análisis estadístico para su validación, tomando en cuenta que este será empleado como ensayo de control de calidad para producto terminado. Los parámetros evaluados para la validación fueron los siguientes:

### a) Del Sistema de Medición:

- Precisión
- Linealidad

### b) Del Método Analítico:

- Exactitud

- Linealidad
- Reproducibilidad
- Especificidad
- Estabilidad de la Muestra

Los parámetros fueron evaluados con el apoyo del material bibliográfico proporcionado por la compañía, recabados del curso "Estadística Aplicada a la Validación de Métodos Analíticos", impartido por el centro de actualización profesional CSEBIOFAR (Consultorio y Servicios en Estadística Biomédica y Farmacéutica AP), y por el material de apoyo del curso "Validación" impartido por la Asociación Farmacéutica Mexicana.

a) Parámetros del Sistema de Medición.

- Precisión:

1. Preparación de la Solución Stock de Alantoína.

Se pesó una cantidad de Alantoína estándar de referencia de aproximadamente 500 mg y se transfirieron a un vaso de precipitados de 500 ml, agregando 400 ml de agua destilada y disolviendo con ayuda de agitación y calentamiento (50 °C), durante 10 min., enfriando a temperatura ambiente. Se transfirió la solución a un matríz volumétrico de 500 ml llevando a volumen con agua destilada.

2. Procedimiento.

Se tomaron 8 alícuotas de 50 ml de la solución anteriormente preparada con pipetas volumétricas transfiriéndolas a vasos de precipitados de 250 ml. A cada una se adicionó 10 ml más de agua destilada y 116 ml de acetona R. A. Se tituló potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N utilizando el programa No. 3 del titulador potenciométrico automático. Se registró el volumen

consumido, restándole el valor de una solución blanco, preparada de la misma manera, pero sin Alantoína.

Con cada volumen obtenido, se calcularon los mg de Alantoína detectados por el sistema, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{V \times F \times 158.12 \times 100}{1000} = \text{mg de Alantoína}$$

Donde:

V = Volumen consumido por la muestra - volumen consumido por el blanco.

F = Factor de Normalidad de la solución titulante.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

| Muestra | V (ml) de NaOH<br>0.1099 N |
|---------|----------------------------|
| Bco.    | 0.0778                     |
| 1       | 2.9570                     |
| 2       | 2.8914                     |
| 3       | 2.9043                     |
| 4       | 2.8907                     |
| 5       | 2.9354                     |
| 6       | 2.9029                     |
| 7       | 2.8795                     |
| 8       | 2.8904                     |

$$\bar{x} = 2.9065 \text{ ml}$$

$$s_x = 0.0264$$

$$\text{D.E.R.} = \frac{0.0264}{2.9065} \times 100 = 0.9083 \%$$

Criterio de aceptación: D.E.R. no mayor de 1.5 %



Conclusión: como el valor de la desviación estándar relativa obtenida experimentalmente no excedió de 1.5 %, por lo tanto, el sistema de medición puede considerarse PRECISO bajo las condiciones experimentales establecidas.

- Linealidad:

1. Preparación de la Solución Stock de Alantoína.

Se pesó una cantidad de Alantoína estándar de referencia de aproximadamente 1.0 g, transfiriéndolo a un vaso de precipitados de 1000 ml. Se adicionaron 800 ml de agua destilada y disolviéndolos con ayuda de agitación y calentamiento ligero (50 °C) durante 10 min. Se enfrió la solución a temperatura ambiente y se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 ml, completándose el volumen con agua destilada.

2. Procedimiento.

De la solución anterior se tomaron alícuotas de 40, 45, 50, 55 y 60 ml, las cuales corresponden respectivamente al 80, 90, 100, 110 y 120 % de la cantidad detectada por el método. Se ajustó cada alícuota a 60 ml con agua destilada, realizando el análisis por triplicado para cada nivel de concentración y adicionando a cada una de ellas 116 ml de acetona R. A., para luego titular potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N, de la misma manera que el procedimiento anterior, utilizando el programa No. 3 del titulador potenciométrico automático.

Se registraron los ml consumidos por cada muestra calculando lo mg de Alantoína detectados por el sistema, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$V \times F = 158.12 \times 100 = \text{mg de Alantoína}$$


---


$$1000$$

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

TABLA DE RESULTADOS. LINEALIDAD DEL SISTEMA

| Concentración<br>(mg) | Porcentaje<br>% | -- Volumen (ml) NaOH 0.1099 N -- |           |           |
|-----------------------|-----------------|----------------------------------|-----------|-----------|
|                       |                 | Replica 1                        | Replica 2 | Replica 3 |
| 39.2235               | 80              | 2.3554                           | 2.3267    | 2.3252    |
| 44.1265               | 90              | 2.6180                           | 2.6482    | 2.6083    |
| 49.0865               | 100             | 2.9047                           | 2.8896    | 2.9159    |
| 53.9323               | 110             | 3.1767                           | 3.1696    | 3.1954    |
| 58.8353               | 120             | 3.4346                           | 3.4526    | 3.4433    |

Datos de regresión:

$$\text{Pendiente } m = 0.1110$$

$$\text{Ordenada al origen } b = 0.0568$$

$$\text{Coeficiente de correlación } r = 0.9994$$

$$r = 0.9989$$

De acuerdo a los valores obtenidos para evaluar linealidad del sistema, se puede apreciar que el valor de pendiente es muy pequeño. Por esta razón los datos de pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación fueron analizados mediante un programa estadístico de acuerdo a una tabla de análisis de varianza. Al final de este, se ponderan los datos utilizando el estadígrafo "F".

El valor "F" registrado en "Regresión residual" representa la relación entre "x" y "y", de acuerdo a lo siguiente:

$$y = mx + b$$

Si  $m = 0$ , esto implica que el término  $mx$  es igual a 0 y por

lo tanto no hay relación entre "x" y "y". Entonces el planteamiento de la hipótesis es el siguiente:

$$H_0 : \rho = 0$$

$$H : \rho \neq 0$$

Se concluye entonces que, si el valor de  $F_{cal} > F_{tab}$ , esto implica que existe una relación entre "x" y "y" rechazándose  $H_0$ .

Para los valores de "F" obtenidos en linealidad tenemos que:

$$F_{cal} = 11297.8$$

por lo tanto se rechaza  $H_0$

$$F_{tab} = 2.143$$

Esto quiere decir que existe una relación entre "x" y "y".

#### b) Parámetros del Método Analítico.

Previo a la determinación de los parámetros del método analítico, se realizó el cálculo de la pureza de la materia prima empleada con respecto a un estándar de referencia, mediante el siguiente procedimiento.

Se pesaron 3 muestras de Alantoína materia prima y una de Alantoína estándar de referencia (pureza 98 %), de aproximadamente 50 mg dentro de vasos de precipitado de 250 ml, agregándoseles 60 ml de agua destilada disolviéndose con ayuda de agitación y calentamiento ligero. Se enfrió a temperatura ambiente, agregándole a cada una de ellas 116 ml de acetona R. A. y titulándose potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N. Se registraron los ml consumidos por las muestras y por el estándar, los cuales fueron sustituidos en la siguiente expresión:

$$\frac{\text{ml muestra}}{\text{ml estándar}} \times \frac{\text{mg estándar}}{\text{mg muestra}} \times F \times \text{Pureza del estándar} = \text{Pureza de la muestra}$$

TABLA DE RESULTADOS

| Muestra | Volumen (ml)<br>NaOH 0.1043 N | mg de Alantoina |
|---------|-------------------------------|-----------------|
| -----   | -----                         | -----           |
| 1       | 3.0368                        | 50.7            |
| 2       | 3.1500                        | 52.7            |
| 3       | 3.0924                        | 51.5            |
| Std.    | 3.0662                        | 52.0            |

Para la materia prima Alantoina No. lote ABSA A80615, la pureza promedio calculada fue la siguiente:

$$\text{Muestra 1: } \frac{3.0368}{3.0662} \times \frac{52.0}{50.7} \times 1.043 \times 98 = 103.74$$

$$\text{Muestra 2: } \frac{3.1500}{3.0662} \times \frac{52.0}{52.7} \times 1.043 \times 98 = 103.61$$

$$\text{Muestra 3: } \frac{3.0924}{3.0662} \times \frac{52.0}{51.5} \times 1.043 \times 98 = 104.09$$

Pureza promedio = 103.81 %

Con esta pureza de materia prima se calcularon los mg de Alantoina que se adicionaron, en base a la pureza referida al estándar para cada parámetro de validación.

A continuación se describen los procedimientos mediante los cuales se evaluaron los parámetros del método analítico.

## 1. Preparación de la Muestra.

Se pesaron 10 muestras de aproximadamente 50 mg de Alantoína (estandar secundario de referencia 98 %), en frascos ámbar. A cada uno se les agregó 2.5 g de placebo de la suspensión, mezclando con una espátula. Se selló cada frasco con parafila y se dejó reposar durante 4 días a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.

## 2. Análisis de las muestras.

Transcurrido el tiempo de reposo, se agregó a cada frasco 2.0 g de tierra de diatomeas con lavado ácido y 0.8 ml de fase estacionaria, mezclándose con una espátula y depositándose cada muestra en una columna previamente empacada como se indica en el procedimiento experimental.

Las 10 columnas se eluyeron cada una con 140 ml de acetato de etilo saturado con agua (fase móvil). Cuando la fase anterior corría justo por encima del soporte, se adicionó 5 ml de éter etílico saturado con agua; y después, cuando esta fase corría justo por encima del soporte, se adicionó 35 ml más de éter etílico saturado con agua. Se dejaron secar las columnas, adicionándoles 20 ml de agua deionizada a 30 C. Cuando la fase de agua corría justo por encima del soporte, se adicionaron 40 ml más de agua deionizada a 50 C. dejando eluir la fase acuosa hasta secar la columna. Se colectó esta fase y se adicionó 116 ml de acetona R. A. y se tituló potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N, empleando para ello el programa No. 3 del titulador potenciométrico automático. Los ml registrados para cada muestra fueron los siguientes:

CUADRO DE RESULTADOS. EXACTITUD DEL METODO ANALITICO.

| Muestra | Volumen (ml)<br>NaOH 0.1256 N | mg agregados | mg recuperados | % de<br>recobro |
|---------|-------------------------------|--------------|----------------|-----------------|
| 1       | 2.5016                        | 49.882       | 49.681         | 99.59           |
| 2       | 2.4967                        | 50.372       | 49.584         | 98.43           |
| 3       | 2.5503                        | 50.568       | 50.649         | 100.16          |
| 4       | 2.4673                        | 48.558       | 49.000         | 98.81           |
| 5       | 2.4969                        | 50.568       | 49.588         | 98.06           |
| 6       | 2.5632                        | 50.862       | 50.905         | 100.08          |
| 7       | 2.5484                        | 50.764       | 50.611         | 99.70           |
| 8       | 2.5968                        | 50.568       | 51.572         | 101.98          |
| 9       | 2.5456                        | 49.784       | 50.555         | 101.54          |
| 10      | 2.5153                        | 49.392       | 49.954         | 101.14          |

El análisis estadístico de los resultados obtenidos es el siguiente:

$$n = 10$$

$$x = 99.949 \quad \text{D.E.R.} = \frac{1.3123}{99.949} \times 100 = 1.3129 \%$$

$$s = 1.3123$$

Se empleo el estadígrafo "t" de student para ponderar los datos obtenidos, de manera que, el planteamiento de las hipótesis es el siguiente:

$$H_0 : \text{Muestra} = 100 \%$$

$$H : \text{Muestra} = 100 \%$$

$$t = \frac{x - 100}{s / \sqrt{n}}$$

$$t = \frac{99.949 - 100}{1.3123 / \sqrt{10}}$$

$$t = 0.1229 \quad \text{Valor "t" calculado}$$

El valor teórico de "t" con un nivel de significancia de

$\alpha = 0.05$ , grados de libertad g.l =  $n - 1$ , es el siguiente:

$$t = 1.8331 \text{ Valor "t" de tablas}$$

Como  $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$ , el método puede considerarse exacto, bajo las condiciones experimentales anteriormente establecidas.

#### INTERVALO DE CONFIANZA.

$$\text{I. C.} = \bar{x} \pm t_{\text{cal}} (s / \sqrt{n})$$

$$\text{I. C.} = 99.949 + 0.1229 (1.3123 / \sqrt{10})$$

$$99.898 \% < x < 100 \%$$



- Linealidad:

La linealidad del método analítico, fué evaluada en 5 niveles diferentes de concentración cada uno con tres replicas, de acuerdo al siguiente esquema:

| <u>Nivel (%)</u> | <u>mg de Alantoina</u> |
|------------------|------------------------|
| 80               | 40                     |
| 90               | 45                     |
| 100              | 50                     |
| 110              | 55                     |
| 120              | 60                     |

1. Preparación de las Muestras.

Se pesaron por triplicado cantidades de Alantoina correspondientes a los niveles señalados en el esquema anterior en frascos ámbar; se les adicionó 2.5 g del placebo de la suspensión y se mezclaron con una espátula. Se sellaron los frascos con parafilm y se dejaron reposar durante 4 días a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.

2. Análisis de las Muestras.

Transcurrido el tiempo de reposo, se le adicionó a cada frasco 2.0 g de tierra de diatomeas con lavado ácido y 0.8 ml de fase estacionaria. Se mezcló cada una con una espátula, adicionando esta mezcla dentro de columnas cromatográficas previamente empacadas y lavadas como se indica en el procedimiento experimental. Los resultados obtenidos se anotan a continuación en el siguiente cuadro:

CUADRO DE RESULTADOS. LINEALIDAD.

| Columna | V (ml) NaOH<br>0.10935 N | mg agregados | mg recuperados | % de<br>recobro |
|---------|--------------------------|--------------|----------------|-----------------|
| 80.1    | 2.3336                   | 40.0241      | 40.3489        | 100.81          |
| 80.2    | 2.3341                   | 40.1236      | 40.3576        | 100.58          |
| 80.3    | 2.3249                   | 40.3228      | 40.1639        | 99.61           |
| 90.1    | 2.6034                   | 45.5000      | 45.0139        | 98.93           |
| 90.2    | 2.6407                   | 45.0022      | 45.6588        | 101.46          |
| 90.3    | 2.6713                   | 45.5996      | 46.1879        | 101.29          |
| 100.1   | 2.9421                   | 49.9803      | 50.8702        | 101.78          |
| 100.2   | 2.9369                   | 50.4781      | 50.7802        | 100.60          |
| 100.3   | 2.9400                   | 50.4781      | 50.8338        | 100.70          |
| 110.1   | 3.3148                   | 57.6466      | 57.3143        | 99.42           |
| 110.2   | 3.4737                   | 58.8414      | 60.0617        | 102.07          |
| 110.3   | 3.2248                   | 55.6554      | 55.7582        | 100.18          |
| 120.1   | 3.5288                   | 61.3304      | 61.0144        | 99.48           |
| 120.2   | 3.4213                   | 59.9366      | 59.1557        | 98.70           |
| 120.3   | 3.4121                   | 59.6379      | 58.9966        | 98.92           |

Análisis estadístico de los datos de Linealidad:

$$m = 1.1889$$

$$b = 0.9781$$

$$r = 0.9973$$

$$r = 0.9946$$

$$s_x = 760.5571$$

$$s_x = 39400.0966$$

$$s_y = 762.5161$$

$$s_y = 39568.7553$$

$$s_{xy} = 39481.9561$$

$$x = 50.7038$$

$$y = 50.8344$$

$$s_x = 7.7319$$

$$s_y = 7.5909$$

Analizando los resultados obtenidos, se puede observar que, de acuerdo a los criterios para considerar la linealidad de un método analítico, el valor de la ordenada al origen, no cae dentro del límite de aceptación. Es por ello que se hizo una ponderación del valor obtenido experimentalmente usando el estadígrafo "t" student.

Cálculo del error típico de estimación modificado:

$$S_y / x = \sqrt{\frac{s_y^2 - a \sum Y - b \sum xy}{n - 2}}$$

$$= \sqrt{\frac{39568.7553 - [(1.1889)(762.5161)] - [(0.9791)(39481.9561)]}{15 - 2}}$$

$$S_y / x = 0.6455$$

Evaluación de la ordenada al origen:

Planteamiento de las hipótesis:

$$H_0 : b = 0$$

$$H : b = 0$$

$$t_{cal} = \frac{b - B}{\frac{s_y}{x} \sqrt{\frac{x^2}{n(x_i - \bar{x})^2}}}$$

En donde:

b = ordenada al origen experimental

B = ordenada al origen esperada

n = número de datos

$s_y / x$  = error típico de estimación modificado

$\bar{x}$  = valor medio

$x$  = miligramos de Alantoína

$$t_{cal} = \frac{1.1889 - 0}{0.6455 \sqrt{\frac{39400.0966}{15 (836.9565)}}}$$

$$t_{cal} = 1.0397$$

$$t_{tab} = 1.7709 \text{ para } \alpha = 0.05 \%, g.l = 13$$

Como  $t_{cal}$  es menor que  $t_{tab}$ , esto implica que puede considerarse la ordenada al origen obtenida experimentalmente como

$$b = 0.$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$b \pm 2.1604 \left\{ s_{x/y} \sqrt{\frac{x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \right\}$$

$$- 1.2816 < b < 3.6594$$

Por lo tanto, el método analítico puede considerarse lineal para la cuantificación de Alantoína bajo las condiciones anteriormente establecidas.

## 1. Preparación de las Muestras.

Esta prueba se realizó preparando 3 muestras por analista al 100 %, para analizar en 2 días diferentes. Se pesaron aproximadamente 50 mg de Alantoina y se les adicionó 2.5 g de placebo de la suspensión. Se dejaron reposar 4 días antes de cada análisis a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco, dentro de frascos ámbar sellados con parafilm.

## 2. Análisis de las Muestras.

A cada muestra se le adicionó 2.0 g de tierra de diatomeas con lavado ácido y 0.8 ml de fase estacionaria. Se mezclaron con espátula y se empacó cada una de ellas en una columna cromatográfica previamente empacada y lavada como se indica en el procedimiento experimental. Se analizaron las muestras teniendo cuidado, por parte del otro analista, en los siguientes puntos:

- a) La manera de empacar las columnas y su compactación.
- b) La forma de eluir las columnas con la fase final (agua).
- c) La manera de trasvasar la muestra dentro de la columna.
- d) Se cambió la solución del electrodo y se preparo solución titulante.

CUADRO DE RESULTADOS. REPRODUCIBILIDAD.

| Columna | V. (ml) NaOH | mg agregados | mg recuperados | % de recobro |
|---------|--------------|--------------|----------------|--------------|
| A 111   | 3.2498       | 49.98        | 50.20          | 100.44       |
| A 121   | 3.2951       | 50.88        | 50.90          | 100.04       |
| A 131   | 3.5254       | 54.56        | 54.41          | 99.72        |
| A 112   | 3.3434       | 52.07        | 51.65          | 99.19        |
| A 122   | 3.3249       | 51.37        | 51.36          | 99.98        |
| A 132   | 3.2442       | 50.28        | 50.12          | 99.68        |
| A 211   | 3.1020       | 48.09        | 47.92          | 99.64        |
| A 221   | 3.2148       | 50.18        | 49.66          | 98.97        |
| A 231   | 3.2682       | 50.68        | 50.49          | 99.62        |
| A 212   | 3.2518       | 50.88        | 50.23          | 98.73        |
| A 222   | 3.2408       | 50.48        | 50.06          | 99.17        |
| A 232   | 3.3055       | 51.27        | 51.06          | 99.59        |

A            1            1            1

Análisis    Día            Muestra    Analista

ANÁLISIS DE RESULTADOS. REPRODUCIBILIDAD.

|            | Día 1  | Día 2 |            |
|------------|--------|-------|------------|
|            | 100.44 | 99.64 |            |
| Analista 1 | 100.04 | 98.97 | Y = 598.43 |
|            | 99.72  | 99.62 |            |
|            |        |       |            |
|            | 99.19  | 98.73 |            |
| Analista 2 | 99.98  | 99.17 | Y = 596.34 |
|            | 99.68  | 99.59 |            |

X1 = 599.05    X2 = 595.72

Sumatoria total: Y = 1194.77

FACTORES FIJOS.

TABLA DE RESULTADOS (ANAEVA). REPRODUCIBILIDAD.

| Fuente de error      | g.l. | Suma de cuadrados  | Media cuadrática   | F cal   | F tab |
|----------------------|------|--------------------|--------------------|---------|-------|
| Analista             | 1    | 0.3940             | 0.3940             | 12.7097 | 161.4 |
| Día                  | 1    | 0.9241             | 0.9241             | 30.4548 | 161.4 |
| Interacción<br>A - D | 1    | $3.1 \cdot 10^{-}$ | $3.1 \cdot 10^{-}$ | 0.0250  | 5.32  |
| Error                | 8    | 1.2388             | 0.1548             |         |       |

FACTORES ANIDADOS

TABLA DE RESULTADOS (ANAEVA). REPRODUCIBILIDAD.

| Fuente de error | g.l. | Suma de cuadrados | Media cuadrática | F cal  | F tab |
|-----------------|------|-------------------|------------------|--------|-------|
| Analista<br>A i | 1    | 0.3940            | 0.3940           | 0.8250 | 18.51 |
| Día D j         | 2    | 0.9551            | 0.4776           | 3.0833 | 4.46  |
| Error E k       | 8    | 1.2388            | 0.1549           |        |       |

Para los mismos datos de reproducibilidad se calcularon los parámetros siguientes:



| Muestra | % de recobro |
|---------|--------------|
| A 111   | 100.44       |
| A 112   | 100.04       |
| A 113   | 99.72        |
| A 211   | 99.19        |
| A 212   | 99.98        |
| A 213   | 99.68        |
| A 121   | 99.64        |
| A 123   | 99.62        |
| A 221   | 98.73        |
| A 222   | 99.17        |
| A 223   | 99.59        |

Para los cuales:  $x = 99.56 \%$   
 $s = 0.4822$   
 $C.V. = 0.4883$

#### CALCULO DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ANALITICO.

a) Repetibilidad:

$$\text{Rep.} = 100 + (196) (M.C.)$$

$$\text{Rep.} = 100.7714$$

b) Reproducibilidad interdía para el analista:

$$\text{Rep.} - d = 100 + (1.96) [(M.C. - M.C.) / r]$$

$$\text{Rep.} - d = 100.0226$$

c) Reproducibilidad interanalista:

$$\text{Rep.} - a = 100 [(M.C. - M.C.) / (r * d)]$$

$$\text{Rep.} - a = 99.9659$$

**Conclusión:**

Observando los valores de  $F_{cal}$  comparados con los valores de  $F_{tab}$ , se puede decir que el método analítico no presenta efecto significativo con respecto al analista y al día.

**Criterio de aceptación:**

Fuente de variación

Criterio

Analista A

$F_{cal} < F_{tab}$

Día D

$F_{cal} < F_{tab}$

## 1. Preparación de la Muestra:

Se pesaron para cada condición 10 muestras de 50 mg de Alantoína cada una. Se les adicionó 2.5 g de placebo de la suspensión, dejándose reposar durante 4 días antes del análisis a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco, dentro de frascos ambar sellados perfectamente con parafilm.

## 2. Análisis de las Muestras:

A cada frasco que contenía la muestra se le adicionó 2.0 g de tierra de diatomeas con lavado ácido y 0.8 ml de fase estacionaria. Se mezcló con espátula hasta uniformidad para después depositarlas dentro de columnas cromatográficas previamente empacadas y lavadas como se indica en el procedimiento experimental. Se procedió como se indica en el procedimiento analítico.

Después de colectar el último eluato de agua de cada una de las muestras, éstas se sometieron a cada una de las siguientes condiciones:

- A. Luz ultravioleta.
- B. Oscuridad.
- C. Refrigeración.

Para cada condición se realizaron determinaciones por duplicado de las muestras expuestas durante 5, 18, 24 y 48 hrs. después de su elución. Para cada condición se titularon dos muestras al inicio (tiempo cero). Se calcularon los mg de Alantoína recuperada para cada muestra, graficándose los valores obtenidos contra el tiempo de exposición.

**ANALISIS DE RESULTADOS. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.****Condición: Luz ultravioleta.**

| <u>Muestra</u> | <u>t (hrs.)</u> | <u>mg adicionados</u> | <u>mg recuperados</u> |
|----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| 1.0            | 0               | 50.4                  | 49.4                  |
| 1.1            | 0               | 51.0                  | 52.4                  |
| 2.0            | 5               | 50.8                  | 50.4                  |
| 2.1            | 5               | 51.1                  | 50.4                  |
| 3.0            | 23              | 50.1                  | 51.6                  |
| 3.1            | 23              | 50.8                  | 53.0                  |
| 4.0            | 28              | 51.0                  | 51.7                  |
| 4.1            | 28              | 50.5                  | 53.5                  |
| 5.0            | 47              | 50.4                  | 50.2                  |
| 5.1            | 47              | 50.9                  | 50.8                  |

**Condición: Oscuridad.**

| <u>Muestra</u> | <u>t (hrs.)</u> | <u>mg adicionados</u> | <u>mg recuperados</u> |
|----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| 1.0            | 0               | 49.4                  | 50.7                  |
| 1.1            | 0               | 52.4                  | 53.5                  |
| 2.0            | 5               | 52.2                  | 50.9                  |
| 2.1            | 5               | 50.4                  | 51.8                  |
| 3.0            | 24              | 51.6                  | 52.1                  |
| 3.1            | 24              | 53.0                  | 47.1                  |
| 4.0            | 29              | 51.7                  | 54.2                  |
| 4.1            | 29              | 53.5                  | 52.4                  |
| 5.0            | 48              | 50.2                  | 52.4                  |
| 5.1            | 48              | 50.8                  | 45.2                  |

| Condición: Refrigeración. |                 |                       |                       |
|---------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| <u>Muestra</u>            | <u>t (hrs.)</u> | <u>mg adicionados</u> | <u>mg recuperados</u> |
| 1.0                       | 0               | 59.2                  | 53.9                  |
| 1.1                       | 0               | 50.1                  | 50.9                  |
| 2.0                       | 6               | 51.7                  | 54.3                  |
| 2.1                       | 6               | 51.3                  | 55.9                  |
| 3.0                       | 24              | 50.6                  | 55.5                  |
| 3.1                       | 24              | 51.6                  | 54.9                  |
| 4.0                       | 30              | 51.1                  | 54.7                  |
| 4.1                       | 30              | 51.2                  | 51.2                  |
| 5.0                       | 48              | 50.3                  | 51.2                  |
| 5.1                       | 48              | 50.7                  | 51.2                  |

#### ANALISIS DE RESULTADOS ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Observando los resultados de la prueba de estabilidad de la muestra, se puede decir que dicha estabilidad después de la elución es mucho mayor cuando estas han sido sometidas a bajas temperaturas. Aunque los valores que se registraron fueron un poco altos, se nota una mayor continuidad de ellos.

La siguiente condición que establece una mayor estabilidad de la muestra es la obscuridad. Estos, como se puede observar, están más cercanos a la cantidad adicionada aunque se presentan algunas variaciones.

Cuando se exponen las muestras eluidas se exponen a la luz ultravioleta, se nota que con el tiempo no presenta variación significativa. Sin embargo, en los tres casos, solo se puede asegurar un resultado confiable si las muestras se titulan durante las siguientes 5 horas después de su elución.

- Especificidad (Interferencias).

El método propuesto se probó con una columna que contenía una muestra de placebo de la suspensión, para titular potenciométricamente el eluato final de agua con hidróxido de sodio 0.1 N. Se observó que en el aparato no se registra señal alguna debido al placebo. Cuando no se secan bien las columnas de los restos de éter que pudieran quedar, se registró un ligero consumo que no sobrepasa los 0.08 ml.

Se eluyó una columna con el método propuesto, la cual contenía únicamente tierra de diatomeas con lavado ácido. El eluato final de agua se tituló potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N. Al igual que la prueba anterior no se registró consumo alguno de titulante.

Se pueden crear interferencias en la valoración final de Alantoína cuando ocurra lo siguiente:

- a) Se fracture el empaque dentro de la columna.
- b) Cuando se adicionen los volúmenes de fase orgánica incompletos.
- c) Cuando se dejen secar las columnas durante la elución con los solventes orgánicos. Solo se deben dejar secar cuando la fase final sea éter y cuando sea agua.
- d) Cuando se adicione agua a una mayor temperatura que la establecida, pudiendo provocar proyecciones y como en consecuencia, el derramamiento de la solución acuosa que contiene Alantoína.
- e) También se observó que de un lote a otro de tierra de diatomeas se pueden presentar variaciones en el resultado. Cuando esto suceda es necesario cambiar de empaque

por un lote reciente. Si se presentan interferencias (que en caso de existir son mínimas) se puede emplear una columna blanco.



## **VI. DISCUSION DE RESULTADOS Y COMENTARIOS**

## VI. DISCUSION DE RESULTADOS Y COMENTARIOS.

El método analítico propuesto se puede considerar como una buena técnica analítica para cuantificar Alantoína en la suspensión. sin embargo, implica mucho error en su desarrollo, debido a la gran manipulación que se lleva a cabo; pero esto no quiere decir que la técnica sea difícil de reproducir, sino que para tener resultados confiables, es necesario realizarla considerando ciertos puntos que se mencionarán más adelante.

Dada la naturaleza de compuesto cercano a la neutralidad que tiene Alantoína y a la poca solubilidad de ésta en compuestos orgánicos, la mayoría de las técnicas analíticas para productos farmacéuticos, se basa en las reacciones de hidrólisis y derivatización de los productos resultantes, los cuales se hacen reaccionar con un cromógeno para después leer un valor de absorbancia en el espectrofotómetro. La técnica que inicialmente se utilizaba para cuantificar Alantoína se basa en este principio. Sin embargo al hacer un barrido del derivado colorido resultante contra una solución estándar de Alantoína tratada de la misma manera que la muestra, se observó que, a la misma longitud de onda, había un defasamiento de ambas curvas, por lo que se concluyó que el punto crítico de la técnica, es el momento de la extracción y la formación del compuesto colorido. Esto puede deberse a que muy posiblemente, componentes de la formulación que tengan una solubilidad semejante a Alantoína en el medio de reacción, o a la naturaleza química similar, reaccionen formando un compuesto colorido al igual que Alantoína y en consecuencia absorban a esa misma longitud de onda.

Se buscó entonces en la literatura otro método alternativo

encontrándose este método propuesto para cuantificar Alantoína en cremas. Dicho método se basa en la separación de todos los excipientes de la crema y después la extracción de Alantoína que se encuentra retenida por la fase estacionaria dentro de la columna, haciendo pasar por esta una porción de agua deionizada. Después de esto se colecta la fase acuosa adicionándole acetona para titular potenciométricamente con hidróxido de sodio 0.1 N.

Inicialmente se probó el método pesando una porción de la suspensión equivalente a 25 mg de Alantoína de la misma manera como se indica en el artículo. Los primeros resultados fueron obtenidos por titulación de las muestras en forma manual con una bureta de 10 ml y registrando los valores de pH a intervalos de 0.05 ml, hasta un pH 12 registrado con un potenciómetro. Los puntos de equivalencia se calcularon de acuerdo al criterio de la primera y segunda derivada obteniéndose resultados de un 97.4 % de recobro.

Después de esta prueba se fabricó un lote de placebo de la suspensión, para emplear el método con placebos cargados. Cabe señalar que debido a la sensibilidad de la balanza analítica disponible, se cambió la cantidad de Alantoína detectada por el método de 25 a 50 mg (cantidad que representa el límite inferior que detecta la balanza con cierta exactitud). En consecuencia se aumentó la cantidad adicionada de placebo y de tierra de diatomeas para empacar la columna hasta una altura de 5.6 cm. El empaque utilizado para este método proporcionó, con la misma cantidad en peso establecida por el artículo, una altura de 6.5 cm. Se probaron varias columnas variando la cantidad de empaque y en conse-

cuencia la altura, observándose que a menos de 6.0 cm los resultados varían considerablemente, mientras que a alturas mayores los resultados son más estables. Observándose esto se decidió dejar la misma cantidad de tierra (4.0 g) cuya altura fluctúa entre 6.0 y 6.5 cm.

Otra variante al método fue la cantidad de disolvente empleado para la elución. Esta cantidad se varió en un principio al doble de lo especificado en el artículo. De esta manera se obtienen resultados satisfactorios. Se dejaron estos volúmenes de eluyentes porque, de acuerdo al nuevo peso de la muestra, las cantidades de excipientes también se duplicaron. Pero de esta manera se asegura que salga la mayor parte de los excipientes durante la elución. Se hicieron pruebas de solubilidad de Alantoína con acetato de etilo y éter (ambos saturados con agua) y se observó que el principio activo es prácticamente insoluble en ambos disolventes, pues entre la interfase del soluto con el disolvente, se observa un menisco cóncavo formado por el soluto lo que indica que existen fuerzas de repulsión interfaciales entre ambos.

En cuanto a la cantidad de fase estacionaria, como la altura del empaque es mayor, la distribución de ésta es diferente, en comparación con lo estipulado en el artículo. Por lo tanto se decidió hacer pruebas para ver la influencia de la cantidad de fase estacionaria con relación a la cantidad de Alantoína retenida por esta. Se manejó la misma cantidad de fase estacionaria que establece el artículo dando buenos resultados. En base a una

relación lineal de cantidad de fase estacionaria, se probó adicionando 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y 4.0 ml, pero a medida que aumentaba la cantidad de fase estacionaria, se humectaba mayormente el empaque, dificultándose así su empaqueo en la columna. Se encontró entonces que adicionando 3.6 ml de fase estacionaria se conseguían resultados adecuados y una humectación tal que permita un buen manejo de la tierra de diatomeas al momento de empacarla. Esto justifica, en cierta manera, el por qué no se aumenta la cantidad de fase estacionaria dentro de la columna dado el aumento a la cantidad de Alantoína.

Por lo que respecta a la manera de empacar la tierra de diatomeas dentro de la columna, se utilizaron dos métodos: el primero usando un vortrex para agitar tubos de ensayo y el segundo golpeando suavemente la columna sobre una placa de madera. Usando el primer método, las vibraciones no uniformizan adecuadamente la tierra, mientras que el segundo método sí da la apariencia de uniformidad al empaque. Se trató de estandarizar el número de golpes necesarios para empacar uniformemente la columna. Esto no se consiguió debido a que es un parámetro que depende de la persona que realiza el análisis, puesto que varía la intensidad en el golpeteo de una persona a otra. Por esta razón se decidió mejor establecer en la técnica analítica, que la mejor manera de empacar la columna es mediante un golpeteo suave, hasta que la apariencia del empaque sea uniforme. El golpeteo es necesario que sea suave y pausado, para evitar que el empaque se fracture y en consecuencia le penetre aire.

Para la extracción de Alantoína en la fase final del análisis, se implementó adicionar agua deionizada caliente (50 °C), en

la cual se solubiliza mejor Alantoína. Para ello se tiene primero que secar la columna de los residuos de éter atrapados en ella. Una vez seca, se adicionó a la columna una porción de 20 ml de agua a temperatura ambiente para impregnar la columna y evitar proyecciones provocadas por el éter atrapado. De esta manera la fase acuosa se subdividió en dos porciones. Ambas alícuotas tienen como función común el extraer Alantoína, una en mayor proporción que la otra.

El programa utilizado para detectar el punto de equivalencia de Alantoína, está adaptado para registrar dos puntos de equivalencia que usualmente presenta: uno a pH 8 y otro a pH 12. Se ha observado que solo se ha podido visualizar los dos puntos de equivalencia, cuando la solución de Alantoína en acetona-agua al 66 %, es preparada por disolución de esta en agua y titulada directamente, en cuyo caso, se suman ambos puntos y se determina el volumen total consumido. Para el producto terminado no sucede lo mismo, dado a que el eluato obtenido por el método propuesto, tiene, además de Alantoína pequeñas cantidades de excipientes que varían el pH inicial. Esta materia es intituable, por tratarse de residuos grasos que imparten a la solución únicamente un pH aparente, por no estar disueltos en agua (esto explica la turbidez de la fase acuosa), pero de ninguna manera consumen hidróxido de sodio durante la determinación. Además el propósito de adicionar acetona a la fase acuosa final, es para provocar en la solución un desplazamiento del pKa de Alantoína hacia el rango de pH básico y con esto asegurar que se titule únicamente Alantoína.



## VII. CONCLUSIONES



## VII. CONCLUSIONES.

1. El método propuesto se logró optimizar para la cuantificación de Alantoína, en la medida en la que se lleven a cabo los procedimientos anteriormente descritos en la parte experimental.

2. Las adaptaciones realizadas a la técnica cumplieron con el objetivo propuesto, dado los porcentajes de recobro obtenidos.

3. Las posibles fuentes de error fueron evaluadas durante el trabajo experimental, considerándose fundamentalmente 3: el primero y fundamental en la separación, es el preparado de la columna; el segundo es el montaje de la muestra dentro de la columna y el tercero es la valoración potenciométrica de las muestras eluidas.

4. De la manera anterior y obteniendo la gráfica de los valores registrados, se puede considerar identificada Alantoína siempre y cuando se corra una muestra estándar tratada de la misma manera.

5. En lo que se refiere a la validación del método analítico se puede concluir que éste, aunado a todas las adaptaciones realizadas, puede considerarse validado, dadas las condiciones existentes en el laboratorio y dado también a el análisis estadístico aplicado a los datos experimentales obtenidos, observándose además, que no presenta efecto significativo debido a la manipulación.

6. El método analítico funciona adecuadamente dadas las siguientes condiciones: empacando adecuadamente el empaque dentro de la columna mediante un golpeteo suave contra una placa de madera; evitar fracturar el empaque dentro de la columna; tratar de titular las muestras después de su elusión y si no es así, con-

servarse en refrigeración para su posterior evaluación.

7. Es importante eliminar residuos de éter acumulados en el eluato final, por medio de su tratamiento en ultrasonido, dado a que su presencia en solución puede crear interferencia en la titulación. De esta manera se reduce considerablemente el tiempo de análisis.

8. Ya que hablamos de tiempo de análisis, se puede decir que el tiempo real, tomando en cuenta el tratamiento final por ultrasonido, se reduce a un promedio de 6 horas, pudiendo dejar eluir las columnas con la fracción final de agua durante la noche y titular las muestras al día siguiente.

9. El flujo final de elución de agua es de aproximadamente 1 ml por cada 10 min., dependiendo en todo caso de la manera en que se empaque la columna en un inicio.

10. En general se puede decir que, dadas las condiciones de análisis, el método detecta de manera satisfactoria la presencia de Alantoína en solución, y que cualquier variación a la técnica propuesta, puede afectar significativamente el resultado final y en consecuencia, el análisis del producto terminado.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

## VII. Bibliografía.

- Weber, D. J. and Higgins, J.W.  
"Potentiometric Titration of Allantoin in cream formulations".  
Journal of Pharmaceutical Science  
Vol. 59 No. 12 Dec. 1970
- Skoog, Douglas A.  
"Introducción a la Química Analítica".  
Editorial Reverte, Argentina 1969.
- Strobel, Howard  
"Instrumentación Química".  
(Estudio Sistemático de Análisis Instrumental)  
Editorial Limusa, México 1982.
- Remington 1, "Farmacia".  
Editorial Médica Panamericana  
Buenos Aires, Argentina.
- Young, E. Gordon and Conway, Catherine F.  
"On estimation of Allantoin by the Rimini-Schryver reaction".  
Journal of Biological Chemistry  
Vol. 142 1942.
- Abraham, John, Simeone, Fiorindo A. and Hopkins, Robert W.  
"A sensitive assay of Allantoin"  
Analytical Biochemistry  
Vol. 70 1976.
- Borchers, Raymond.

- "Allantoin Determination".  
 Analytical Biochemistry  
 Vol. 79 1977.
- Billaber, Antony, Willemont, Jacques et Parry, Georges.  
 "Dosage de l'Allantoine dans des produits pharmaceutiques".  
 Annales Pharmaceutiques Francaises  
 Vol. 34 1976.
- Merck Index 170. Edition
- Martindale 270. Edition.  
 "The Extra-Pharmacopoeial".  
 The Pharmaceutical Press  
 London 1977.
- Snell and Snell.  
 "Colorimetric methods of Analysis"  
 Vol. IV AA.
- Welsh, Aston L. and Mitchell, Ede.  
 "Therapeutic effectiveness of Tar-Allantoin Lotion in se-  
 lected dermatoses". Preliminary Report.  
 The Ohio State Medical Journal  
 Stoneman Press Columbus, Ohio  
 Vol 55 No. 6 June 1959.
- Goodman and Gilman.  
 "Bases Farmacológicas de la Terapéutica".  
 4o. Edición  
 Editorial Médica Panamericana.
- Guerra, Johnny  
 "Validación de Métodos Analíticos por laboratorios de la  
 FDA" I.

Pharmaceutical Technology

Marzo 1986.

- Finkelson, Martin J.

"Validación de Métodos Analíticos por laboratorios de la FDA" II.

Journal of Pharmaceutical Science

Marzo 1986.

- Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de manufactura.

"Guía de Procedimientos adecuados de Manufactura Farmacéutica".

2o. Edición 1986.

- Pharmacopeial Forum.

"Current concepts for the validation of compendial Assays".

The United States Pharmacopeial Convention.

March-April 1986.

- Norma IMSS

"Alantoína y Alquitrán de Hulla, Suspensión dérmica".

Clave: 0831

Instituto Mexicano del Seguro Social.

Subdirección General de Abastecimiento.

Jefatura de Control de Calidad.

Enero 1987.