

302827

N:1
2E

UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.



ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**APLICACION DEL METODO DE LA 4-AMINOANTIPYRIDINA
PARA LA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE
FENILEFRINA EN UNA SOLUCION OFTALMICA, DURANTE
EL PROCESO DE MANUFACTURA Y EN ESTUDIOS DE
ESTABILIDAD.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA :

MARIA MIRNA MEJIA MANCILLA

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

AGRADECIMIENTOS

A FISON S DE MEXICO, S.A. DE C.V.

POR TODAS LAS FACILIDADES PROPORCIONADAS PARA LLEVAR A CABO ESTE TRABAJO EXPERIMENTAL.

A LA MADRE GUADALUPE CAMARENA.

POR SU AYUDA INCONDICIONAL Y SU CARIÑO.

A LA Q.F.B GRACIELA SOSA GARCIA.

POR SU VALIOSA COLABORACION EN ESTE TRABAJO.

A LA Q.F.B OLGA GALICIA AGUILAR

Y A LA Q.F.B ROSARIO VAZQUEZ LARIOS.

MUY ESPECIALMENTE LES DEDICO ESTE TRABAJO CON CARIÑO Y RESPETO.
GRACIAS POR SUS ENSEÑANZAS, POR SU INTERES Y AMISTAD.

AL Q.F.I JOSE LUIS CALDERON.

POR SU GRAN AMISTAD Y AYUDA INCONDICIONAL, SIN LA CUAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE CONCLUIR MI TESIS.

DEDICO ESTA META CONCLUIDA A QUIENES ME HAN DADO TODO EL APOYO,
Y A QUIENES SON PARTE MUY IMPORTANTE DE MI VIDA:

A MI MADRE, SRA. MARIA LUISA MANCILLA, CON CARIÑO Y PROFUNDO
AGRADECIMIENTO POR TODO EL APOYO QUE ME HAS DADO A CADA MOMENTO.

A MI PADRE, SR. VICTOR MANUEL MEJIA QUIEN EN ALGUN LUGAR Y DE
ALGUN MODO QUIZA SEPA LE DEDICO ESTE TRABAJO.

A MI HERMANA Y AMIGA MYRIAM CON QUIEN COMPARTO SIEMPRE GRATOS
MOMENTOS.

A MI HERMANO VICTOR HUGO.

HOY DESEO COMPARTIR MI ALEGRIA CON QUIENES DE UNO U OTRO MODO,
LEJOS O CERCA POR POCO O MUCHO TIEMPO HAN FORMADO PARTE IMPORTANTE
DE MI. SON MUCHAS LAS PERSONAS IMPORTANTES Y QUERIDAS Y POCO EL
ESPACIO, SIN EMBARGO A TODOS LES TENGO PRESENTES EN LOS BUENOS
MOMENTOS.

MIS AMIGOS DE TANTO TIEMPO : DULCE, SOCRATES, RAULINI, JOSE LUIS,
GLENDA, JULIO, BARBARINI, MARIO, OS, GUADALUPE Y A NORMA.

MUY ESPECIALMENTE A MAGOS.

POR SU GRAN AMISTAD, COMPRESION, CARIÑO E INTERES. GRACIAS POR
!!! T O D O !!!

A ROBERTO MUY ESPECIALMENTE.

GRACIAS POR TU AMISTAD, CARIÑO Y APOYO.

ALVARO: GRACIAS MIL POR TU AYUDA EN LA IMPRESION.

CUANTAS COSAS BUENAS HEMOS LOGRADO YA EN ESTE AÑO COMPARTIDO,
CUANTAS ALEGRÍAS Y SATISFACCIONES, Y AHORA ESTA, ES UNA MAS.
ESTE PEQUEÑO O GRAN LOGRO, LO DEDICO A TI, QUE ERES SIN DUDA BASE
TRASCENDENTE Y FUNDAMENTAL DE MI VIDA.

GRACIAS MIL POR EL APOYO Y ALEGRÍA, POR LA CONFIANZA Y GRAN AMOR
DE CADA ACTO, POR SER PARTE DE MI, POR ESTOS YA TANTOS DIAS LLENOS
DE ENTUSIASMO Y CARIÑO, POR RECORRER CONMIGO AQUEL DIFÍCIL CAMINO
DEL PASADO, GRACIAS POR ESA CHISPA DE TU VIDA, POR ESA SONRISA,
POR ESTA LIBERTAD Y PAZ EN MI VIDA, POR CRECER A BASE DE VERDADES
SIEMPRE, GRACIAS POR TODO LO BUENO QUE ME HAS DADO.

TAN SOLO QUIERO DECIR QUE LA HUELLA QUE HAS DEJADO EN MI VIDA LA
LLEVO CONMIGO SIEMPRE, EN CADA MOMENTO, CADA DIA, A DONDE ESTE, A
DONDE VOY, HASTA DONDE LLEGUE... Y AUNQUE ENTRE NOSOTROS NO HAGAN
FALTA LAS PALABRAS: **fer**

SOBRE TODOS, SABES, TE DEDICO MI TESIS A TI.

BAJO LA LUZ DE LA CONCIENCIA CLARA,
TODO, INCLUSO EL MIEDO Y EL DOLOR
PUEDEN TRANSFORMARSE.
EL AMOR Y LA CONCIENCIA
CURAN TODO LO QUE TOCAN.

ASI COMO NO NACEMOS SIENDO "HUMANOS"
SINO QUE NOS HACEMOS EN LA MEDIDA EN
QUE DESARROLLAMOS VALORES AUTENTICOS,
CONCIENCIA SOLIDA Y POTENCIALES FIRMEZ;
DE IGUAL MANERA NO SOMOS PROFESIONALES
HASTA QUE DESARROLLAMOS CON INTERES,
CONCIENCIA Y CARIÑO CADA LABOR QUE SE
DESEMPEÑA Y HASTA NO APLICAR CON ETICA
LO APRENDIDO EN LAS AULAS.

MYNA.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCION.

<u>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</u>	1
<u>1.2 OBJETIVO.</u>	3
<u>1.3 HIPOTESIS.</u>	4

CAPITULO II

ANTECEDENTES.

<u>2.1 GENERALIDADES.</u>	5
<u>2.1.1</u> Características físicas y químicas del clorhidrato de fenilefrina.	5
<u>2.1.2</u> Métodos analíticos para la determinación del clorhidrato de fenilefrina.	8
<u>2.1.3</u> Método de la 4-aminoantipirina.	13
<u>2.1.4</u> Farmacología.	19
<u>2.2 ESTABILIDAD.</u>	20
<u>2.2.1</u> Generalidades de estabilidad.	20
<u>2.2.2</u> Tipos de estabilidad.	21
<u>2.2.3</u> Mecanismos de degradación de mayor frecuencia.	23
<u>2.2.4</u> Estabilidad del clorhidrato de fenilefrina.	25

<u>2.3 Validación.</u>	33
<u>2.3.1</u> Generalidades de validación.	33
<u>2.3.2</u> Conceptos de los parámetros de validación.	36
<u>2.3.3</u> Determinación experimental y criterios de aceptación.	39
<u>2.4 ESPECTROFOTOMETRIA.</u>	45
<u>2.4.1</u> Fundamentos de espectrofotometría.	45
<u>2.4.2</u> Aplicación analítica de la radiación electromagnética.	47

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL.

<u>3.1 DIAGRAMAS DE FLUJO.</u>	48
<u>3.1.1</u> Diagrama de flujo del método analítico de la 4-aminoantipirina.	48
<u>3.1.2</u> Diagrama de flujo para la validación del método.	49
<u>3.1.3</u> Diagrama de flujo para determinar la selectividad.	50
<u>3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.</u>	51
<u>3.2.1</u> Material.	51
<u>3.2.2</u> Reactivos.	51
<u>3.2.3</u> Equipo.	51
<u>3.2.4</u> Preparación de reactivos.	52

<u>3.3 METODO ANALITICO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA</u>	53
<u>3.3.1 Cálculos.</u>	54
<u>3.4 METODOLOGIA PARA LA VALIDACION.</u>	55
<u>3.4.1 Especificidad.</u>	55
<u>3.4.2 Selectividad.</u>	55
<u>3.4.3 Presición.</u>	57
<u>3.4.4 Exactitud.</u>	58
<u>3.4.5 Linealidad.</u>	58
<u>3.4.6 Límite de Detección.</u>	58
<u>3.4.7 Límite de Cuantificación.</u>	58
<u>3.4.8 Tolerancia.</u>	58

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION.

<u>4.1 RESULTADOS.</u>	60
<u>4.2 DISCUSION.</u>	73

CAPITULO V

CONCLUSIONES.	75
BIBLIOGRAFIA.	76

CAPITULO

I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad, obtener medicamentos de alta calidad es uno de los objetivos primordiales dentro de la industria farmacéutica ya que sus productos están dirigidos al mejoramiento y/o mantenimiento del estado físico del consumidor y de la calidad óptima de dichos productos depende que el efecto terapéutico para el cual han sido creados, sea el adecuado.

El dictamen sobre la calidad un producto se basa en una serie de evaluaciones sobre el aspecto físico, composición química y estado microbiológico, realizadas sobre una muestra representativa de cada lote fabricado, que van desde el inicio hasta el final de la manufactura.

Dos de los puntos críticos al evaluar la calidad de un medicamento, son sus características químicas y microbiológicas.

La evaluación de estas características, tiene por objetivo verificar que las propiedades medidas que resulten del análisis se encuentren dentro de límites previamente establecidos.

Antes de evaluar un medicamento empleando métodos analíticos, es necesario evaluar dichos métodos, es decir validarlos.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido mediante pruebas experimentales,

que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas (13). Dicha capacidad analítica es expresada en términos de parámetros estadísticos. Específicamente los conceptos de validación enfocados a métodos analíticos se inician en 1974, al publicarse los primeros documentos oficiales que indicaban una guía de los requisitos mínimos para la validación de métodos (14).

Por otra parte, es importante destacar que la responsabilidad de la industria farmacéutica, no termina con la elaboración adecuada del medicamento, sino que esta responsabilidad se prolonga a asegurar que cada una de las unidades elaboradas mantiene su calidad inicial hasta la fecha en la cual se cumple su periodo de vida útil. En otras palabras, es responsabilidad del fabricante asegurar que los componentes del medicamento se encuentran en las concentraciones iniciales y que no hay degradación de las sustancias que conforman la formulación; o que si la hay, la cantidad que se degrada es mínima y se encuentra dentro de límites de seguridad establecidos, hasta que se cumple la fecha de caducidad del producto.

Se asume que ésta responsabilidad por parte del fabricante debe cumplirse siempre y cuando el consumidor mantenga el medicamento bajo las condiciones de almacenaje y con las precauciones que se indiquen.

De lo anterior deriva la necesidad de diseñar estudios de estabilidad, en los cuales se acelere el proceso de degradación de la sustancia de interés, para posteriormente aplicar sobre

una muestra representativa métodos analíticos de características selectivas para la sustancia en cuestión y con ello determinar el periodo de vida útil del medicamento.

De la constante problemática presentada en una industria al obtenerse resultados analíticos variables en la determinación cuantitativa de clorhidrato de fenilefrina en un producto oftálmico durante el control en proceso y en estudios de estabilidad retrospectiva, surge la necesidad de implementar un método analítico confiable que reúna las características adecuadas para ser aplicado tanto en control de proceso, como en pruebas de estabilidad, dando origen de esta manera al presente trabajo experimental. El método analítico propuesto para la determinación de clorhidrato de fenilefrina en dicho producto oftálmico es el de la 4-aminoantipirina.

El método que se emplea actualmente se basa en una determinación espectrofotométrica en la región ultravioleta a una longitud de onda cercana a 272 nm empleando como solvente ácido clorhídrico.

Como método alternativo se emplea una titulación potenciométrica para el ión cloruro para que de manera indirecta se cuantifique la sustancia de interés.

1.2 OBJETIVOS.

Establecer las vías de degradación más factibles a presentarse en el clorhidrato de fenilefrina asociada a un antibiótico en una solución oftálmica.

Proporcionar un método analítico de bajo costo y reducido tiempo de análisis que permita cuantificar el clorhidrato de fenilefrina durante el proceso de manufactura de la solución oftálmica, y que dicho método sea también de carácter selectivo y de aplicación al análisis de muestras sometidas a estudios de estabilidad.

Validar y documentar el método seleccionado.

1.3 HIPOTESIS.

Si el método seleccionado propuesto permite cuantificar el clorhidrato de fenilefrina de manera específica con respecto a los demás componentes de la formulación y a los productos de degradación de la sustancia de interés, además de cumplir con todos los parámetros que implica una validación, el método será considerado adecuado para determinar cuantitativamente el analito de interés.

CAPITULO

II

ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES.

2.1.1 Características físicas y químicas del clorhidrato de fenilefrina.

Químicamente el clorhidrato de fenilefrina es denominado como R-N(3, Dihidroxifenil)-N-metilamino cloruro (12), (25), (26).

* Sinónimos: m-Sinefrina clorhidrato.

1- 1- (m-hidroxifenil) -2-metil aminometanol clorhidrato.

Neosinefrina clorhidrato.

Metaoxedrina Cloruro.

* Peso molecular: 203.7

* Formula condensada: $C_9 H_{14} Cl NO_2$

* Estructura química:

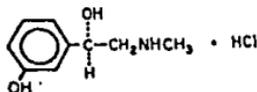


FIGURA I. ESTRUCTURA QUIMICA DEL CLORHIDRATO DE FENILEFRINA

* Descripción:

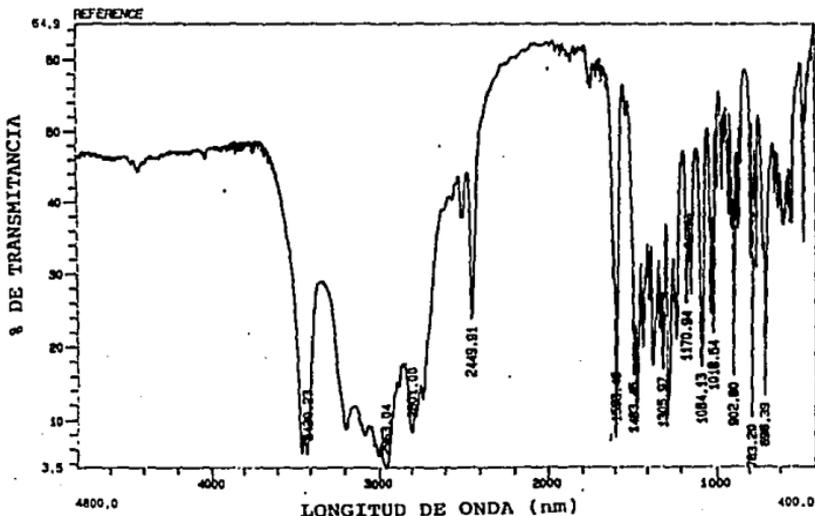
Físicamente es un polvo cristalino de color blanco o casi blanco, sin olor característico y de sabor amargo (12), (26).

* Valoración o ensayo:

Contiene no menos de 98.5% y no más de 101% de clorhidrato de fenilefrina cuando se valora por titulación (5), (26).

* Espectro de absorción de radiación Infrarroja:

Bajo el efecto de radiación Infrarroja, presenta bandas de absorción a 696, 780, 900, 1080, 1270, 1590, 2800, 3420 y 3450 cm^{-1} (2), (7).



Nicolet Instrument
Corporation

FIGURA II. ESPECTRO DE ABSORCION INFRARROJA.

* Solubilidad:

Es soluble en agua a 20°C en una proporción de 1:2, también es soluble 1:4 en etanol y 1:2 en glicerol (7), (25).

* pH de la solución:

Una solución acuosa posee un pH neutro (7), (25).

* Perdida por secado:

Al ser sometido a una temperatura de 105°C pierde como máximo el 1.0% de su peso (26).

* Absorción de radiación ultravioleta:

Bajo el efecto de radiación ultravioleta, el clorhidrato de fenilefrina presentan los siguientes máximos de absorción de acuerdo con los medios de disolución que se indican (2), (7):

TABLA I. MAXIMOS DE ABSORCION DEL CLORHIDRATO DE FENILEFRINA.

MEDIO DE DISOLUCION	LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION	COEFICIENTE DE EXTINCION
Hidróxido de sodio 0.1N	230 nm	429
Acido sulfúrico 1N	273 nm	96
Hidróxido de sodio 0.1N	293 nm	147

* Rotación específica:

Una solución al 2.0% posee una rotación específica de -42° a -47.5° (2), (7), (26).

* Punto de fusión:

Su punto de fusión debe encontrarse entre 140 °C y 145 °C cuando su calidad es U.S.P. (26).

* Residuo de Ignición:

Máximo el 0.2% (5), (26).

* Contenido de cloruros:

Entre 17.0% y 17.7% calculado sobre la substancia seca (5).

* Incompatibilidad química:

El clorhidrato de fenilefrina es incompatible con agentes oxidantes y con metales, ya que en presencia de ellos la molécula tiende a degradarse. Se ha reportado que especialmente cuando se encuentra en combinación con cobre en concentraciones de 10 ppm, se acelera la degradación (12).

2.1.2 Métodos analíticos para la determinación del clorhidrato de fenilefrina.

1) Métodos de análisis que se basan en la técnica de espectrofotometría.

a) Método de reacción con ácido nitroso.

Cuando las soluciones de clorhidrato de fenilefrina en presencia de sales de mercurio son calentadas, se forma un complejo con ácido nitroso produciéndose una coloración roja.

La longitud de onda a la cual se presenta la máxima absorbancia es cercana a 495 nm (7).

b) Reacción con 2,6 dicloroquinona.

En solución y a pH neutro, el clorhidrato de fenilefrina reacciona con 2,6 dicloroquinona. El complejo resultante se determina a 625 nm (7).

c) Método de reacción con p-nitroanilina.

El clorhidrato de fenilefrina forma un complejo diazotizado con p-nitroanilina en medio ácido. El compuesto resultante se cambia a un medio básico, y se determina la absorbancia a una longitud de onda de 495 nm (1) , (7).

d) Método de reacción con sulfolftaleína.

En presencia de sulfolftaleína, a pH neutro o ligeramente básico, se forma un complejo que se extrae con un solvente orgánico de carácter polar, y se determina la absorbancia del complejo colorido formado (7).

e) Método directo.

Es posible determinar el clorhidrato de fenilefrina mediante una lectura directa en el espectrofotómetro de una solución que contenga una concentración adecuada utilizando agua como solvente. La banda de máxima absorción se localiza a una longitud de onda de 272 nm debida a la estructura fenólica del compuesto. Este método tiene severas restricciones, ya que no se puede aplicar para fines cuantitativos si cualquier otro componente presenta máximos de absorción en esta región

(2), (12). En pruebas de estabilidad no tiene aplicación analítica pues los espectros de absorción de soluciones de clorhidrato de fenilefrina sometidas a condiciones de degradación, emiten espectros con máximos de absorción desplazados, con respecto a los obtenidos sobre soluciones recientemente preparadas. Ver figura III.

**BECKMAN
DU-65 SPECTROPHOTOMETER**

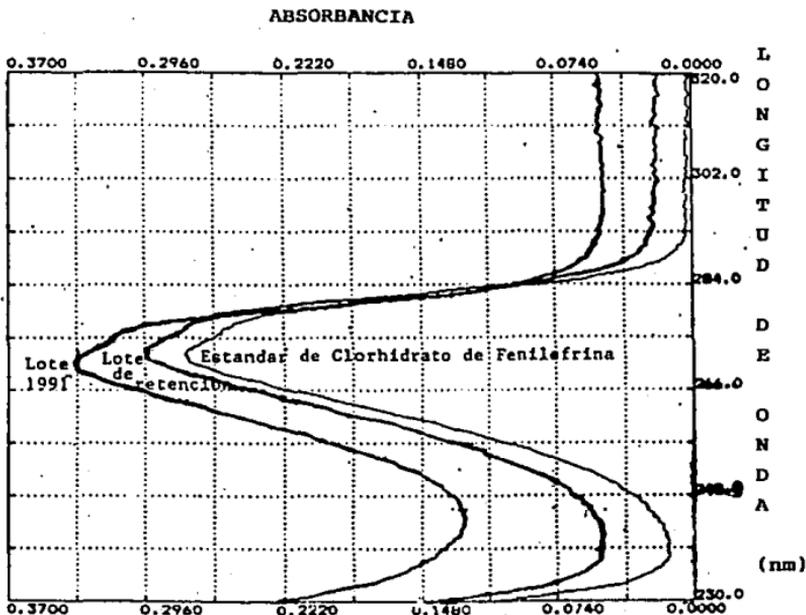


FIGURA III. ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA-VISIBLE

2) Métodos analíticos que involucran técnicas cromatográficas.

a) Método por cromatografía de líquidos.

Entre los métodos reportados, se encuentra comunmente el empleo de octadecilsilano como fase estacionaria, con un tamaño de partícula usualmente recomendado de 5 a 10 micras de diámetro y metanol/agua como fase móvil.

En general se emplea detector de absorción ultravioleta y se refiere 280 nm como longitud de onda adecuada para su determinación (7).

b) Método por cromatografía de gases.

El clorhidrato de fenilefrina puede ser determinado mediante esta técnica de acuerdo a condiciones de operación diversas. En general se refiere como temperatura de la columna 135 °C y 300 °C con detector de ionización.

El empleo de la cromatografía de gases resuelve problemas de separación de mezclas complejas (7), (24).

c) Método por cromatografía de intercambio iónico.

El empleo de esta técnica elimina gran parte de las posibles interferencias en las determinaciones cuantitativas (1).

Pueden emplearse diversos tipos de resinas, sin embargo la más utilizada es la amberlita IR-45 de tipo débil básica. en este caso se emplea una fase móvil de etanol al 75.0% y al final del proceso se hace la cuantificación por medio de una titulación.

3) Métodos por titulación.

a) Método de titulación en medio no acuoso.

El clorhidrato de fenilefrina puede ser cuantificado mediante una titulación en medio no acuoso, empleando cristal violeta como indicador del punto de equivalencia hasta llegar a coloración verde esmeralda (7).

b) Método de bromación.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 5a. Edición y la U.S.P XXII señalan el método de bromación como método oficial (5), (7), (26). Dicho método se lleva a cabo en un matraz de yodo, y consiste en disolver en agua la cantidad especificada de clorhidrato de fenilefrina para adicionar una alícuota de bromo 0.1N y ácido clorhídrico. La determinación se efectúa mediante una titulación residual, titulando el yodo liberado con una solución de tiosulfato de sodio 0.1N empleando solución reactivo de almidón como indicador del punto de equivalencia. La sensibilidad del método y su poca especificidad lo hacen útil para el análisis de materia prima únicamente.

4) Métodos que emplean la técnica de fluorometría.

a) El clorhidrato de fenilefrina posee propiedades fluorescentes de una forma natural. El fenómeno de

fluorescencia se presenta en soluciones ácidas y tiene una sensibilidad de 0.04 mcg/ml a 305 nm (7).

2.1.3 Método de la 4-aminoantipirina.

1) Antecedentes.

En 1943 Edgar Emerson publicó el método de la 4-aminoantipirina para la determinación de fenoles monohídricos.

Dicho método se basa en la reacción de la 4-aminoantipirina con fenoles en presencia de un agente oxidante (4), (15), (16), (18), (27), (28), (30).

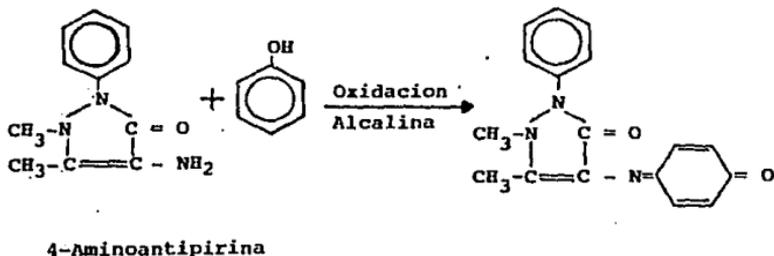


FIGURA IV. REACCION DE LA 4-AMINOANTIPIRINA CON COMPUESTOS FENOLICOS.

Emerson realizó numerosos y extensos estudios sobre la reacción de la 4-aminoantipirina con diversos compuestos fenólicos con la finalidad de determinar el alcance y limitaciones de la reacción. Como resultado de sus estudios publicó lo siguiente:

a) Para que la reacción se lleve a cabo, es necesario que exista un grupo hidroxifenólico libre en la molécula.

b) La posición para debe encontrarse libre, ya que de no ser así la reacción será negativa; excepto si el radical es un halógeno, grupo carboxilo, ácido sulfónico, grupo hidroxilo o metoxilo, en cuyo caso puede existir la posibilidad de una reacción positiva.

c) Un grupo nitro en posición orto evita la reacción, y si se encuentra en posición meta, la reacción se inhibe aunque no por completo.

El método original descrito por Emerson, consiste en la adición de hidróxido de amonio 6N a una muestra del compuesto fenólico en análisis, seguido de una solución de 4-aminoantipirina al 2.0% y una de ferricianuro de potasio al 8.0%.

F.W. Ochynski prosiguió con estudios del método publicado por Emerson, y en 1960 da a conocer los resultados de su investigación, la cual enfocó a la determinación de la cantidad de fenol inactivada por acción de bacterias empleando el método de la 4-aminoantipirina (15).

Ochynski señaló que a un pH inferior de 8, la 4-aminoantipirina por sí misma se oxida, dando como resultado una coloración roja, pero que a un pH superior de 8 el color del complejo

cambia a amarillo; sin embargo el color rojo producido por la reacción 4-aminoantipirina-compuesto fenólico permanece.

Uno de los problemas del método original era la poca estabilidad del complejo colorido, ya que una vez que se lleva a cabo la reacción comienza a decolorarse rápidamente el complejo, por lo cual Ochynski modificó el medio alcalino de la reacción a fin de lograr mayor estabilidad.

Durante su investigación observó además, que si a una solución decolorada se le adicionaba más 4-aminoantipirina y ferricianuro de potasio, se reestablecía el color original de la reacción, lo cual fué explicado de la manera siguiente:

En la mezcla acuosa 4-aminoantipirina - compuesto fenólico - ferricianuro de potasio - carbonato de sodio, se llevan a cabo dos reacciones.

La primera es entre la 4-aminoantipirina y el compuesto fenólico y la segunda es una reacción de oxidación de la 4-aminoantipirina. En presencia del carbonato de sodio, el compuesto fenólico de la primera reacción se separa y la 4-aminoantipirina liberada se oxida; cuando se adiciona más 4-aminoantipirina y agente oxidante, el fenol libre reacciona nuevamente y se reestablece el color.

Ochynski además reportó que la naturaleza del alcalinizante (o amortiguador) no afecta la reacción siempre y cuando el pH se mantenga entre 9.0 y 10.5.

Finalmente, señaló que la variación de la temperatura en un rango de 19 °C a 40 °C y la calidad de la 4-aminoantipirina

(grado reactivo ó purificada) no afectan la reacción. Las determinaciones eran realizadas a 500 y 520 nm.

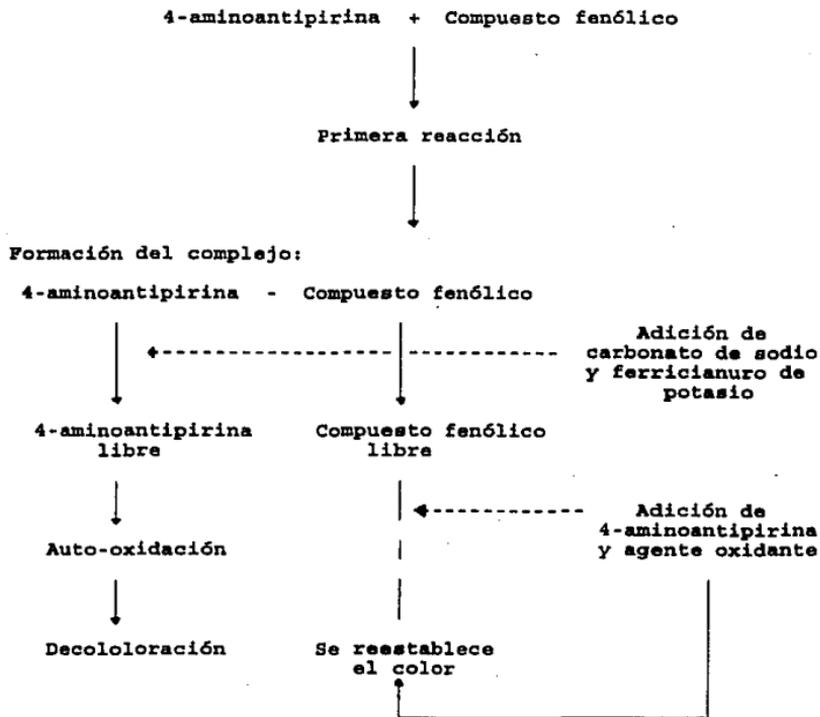


FIGURA V. DECOLORACION Y REESTABLECIMIENTO DE COLOR EN LA REACCION DE LA 4-AMINOANTIPIRINA.

2) Aplicación del método al análisis del clorhidrato de fenilefrina.

En 1961, Hiskey y Levin retomaron el estudio del método para aplicarlo a la determinación cuantitativa del clorhidrato de fenilefrina ya que esta substancia es una fenolamina.

Dos años más tarde, en 1963, K. Thomas y H. Mitchner publicaron los resultados de su investigación, aplicado también al análisis de la misma substancia ya que consideraron que tenía una gran aplicación en el análisis de mezclas coplejas, sin requerirse de una extracción o separación previa.

K. Thomas Koshi y H. Mitchner introdujeron modificaciones al método de Hiskey-Levin, logrando con ello avances importantes. El método descrito por Hiskey y Levin empleaba bicarbonato de sodio (como agente alcalinizante) y el orden de adición de reactivos era el siguiente: 4-aminoantipirina - compuesto fenólico - solución de bicarbonato de sodio - solución de ferricianuro de potasio.

El blanco presentaba una absorbancia inicial elevada (de 0.06 a 0.07 abs.), por lo cual, era necesario esperar 15 minutos antes de poder ajustar el aparato de medición.

Para determinar la absorbancia de las muestras también era necesario esperar los 15 minutos, con lo que se tenía el problema de pérdida de la intensidad del color.

Con las modificaciones de Thomas-Mitchner se logró lo siguiente:

a) Se substituyó la solución de bicarbonato de sodio por una de borato de sodio al 2.0%, obteniéndose con ello un complejo colorido de gran estabilidad.

b) Se modificó el orden de adición de reactivos a: compuesto fenólico- solución de ferricianuro de potasio- solución de borato de sodio- 4-aminoantipirina. Con lo anterior, se elimina la interferencia reportada por Hiskey-Levin derivada de oxidación de la misma 4-aminoantipirina; como resultado de ello, el blanco practicamente no presenta absorbancia y no es necesario esperar 15 minutos antes de realizar la medición sino que por el contrario, se recomienda leer de inmediato a 490 nm.

FIGURA VI. OPTIMIZACION DEL METODO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA

Autor del método y fecha	Reactivos empleados y su orden de adición				
Emerson 1943	Compuesto fenólico	H.D.A 6N	4-AA al 2.0%	F.D.P al 8.0%	Agua
Ochynsky	Compuesto fenólico	T.B.S al 4.0%	4-AA al 3.0%	P.S.D.A al 2.0%	T.B.S al 4.0%
Hiskey - Levin 1961	Compuesto fenólico	4-AA	B.C.D.S	F.D.P	B.C.D.S
Thomas - Mitchner 1963	Compuesto fenólico	F.D.P al 4.0%	B.D.S al 2.0%	4-AA al 3.0%	B.D.S al 2.0%
H.D.A: Hidróxido de amonio 4-AA: 4-aminoantipirina B.D.S: Borato de sodio B.C.D.S: Bicarbonato de sodio		F.D.P: Ferricianuro de potasio T.B.D.S: Tetraborato de sodio P.S.D.A: Persulfato de amonio A: Agua			

2.1.4 Farmacología.

Químicamente el clorhidrato de fenilefrina es una fenolamina con efecto simpaticomimético directo sobre los receptores adrenérgicos principalmente. Su actividad alfa adrenérgica es predominante sobre el Sistema Nervioso Central y dicha actividad es mas débil que la producida por la noradrenalina pero su efecto posee mayor duración (12).

En aplicaciones locales, el clorhidrato de fenilefrina es utilizado como fármaco descongestionante en problemas de rinitis y sinusitis (10), (12).

En soluciones oftálmicas, se puede utilizar en concentraciones al 10.0% para producir midriasis, y es específicamente útil cuando se requiere de un examen ocular a fondo ya que a esta concentración es capaz de producir la dilatación máxima de la pupila en un periodo de 20 minutos, sin producir ciclopejía. También a esta concentración se utiliza en el tratamiento de problemas de inflamación post-operatoria y glaucomas secundarios (12).

En concentraciones cercanas al 0.125%, como es este caso específico, el clorhidrato de fenilefrina actúa como vasoconstrictor en problemas de congestión ocular; también es empleado en el tratamiento de irritación conjuntival, conjuntivitis alérgica y folicular.

Se han observado reacciones sistémicas adversas como taquicardia, hipertensión y raramente miocardia cuando se instilan dosis muy elevadas en el saco conjuntival (10), (12).

2.2 ESTABILIDAD.

2.2.1 Generalidades de Estabilidad.

El término "Estabilidad" con respecto a productos farmacéuticos se refiere a la conservación de las propiedades de un producto. En base a la estabilidad del producto se asigna una fecha de caducidad al mismo, la cual se define como el periodo que transcurre desde el inicio de la manufactura de un medicamento, hasta la fecha en la cual dicho producto mantiene sus características de pureza, inocuidad y efectividad dentro de límites previamente establecidos que aseguren condiciones óptimas para el consumo humano (20), (26).

El diseño de estudios de estabilidad depende fundamentalmente de las características particulares de la substancia de interés, ya que dependiendo de la naturaleza de la substancia, ésta puede ser afectada por diferentes factores como pueden ser la temperatura, luz, aire, humedad, pH, composición del envase primario o componentes de la formulación.

Del diseño adecuado de un estudio de estabilidad pueden derivarse una serie de datos importantes para detectar puntos críticos de la formulación, del envase primario o de las condiciones de almacenaje más adecuadas para el producto.

Antes de diseñar un estudio, es necesario realizar una revisión bibliográfica ya que en base a ello se puede hacer un plan de trabajo con un mínimo de pruebas, pero que finalmente aporte la mayor cantidad de datos útiles.

2.2.2 Tipos de Estabilidad.

La estabilidad de un medicamento se puede evaluar de diversos puntos de vista (20), (26):

1) Estabilidad química.

Cada principio activo mantiene la estabilidad química o potencia que fue declarada al término del proceso de manufactura, o el porcentaje de el o los activos se encuentran dentro de límites previamente establecidos fundamentados en una referencia bibliográfica oficial.

La cuantificación de los activos debe efectuarse con métodos analíticos que tengan un nivel indicativo de estabilidad, es decir, que el método elegido tenga capacidad analítica para determinar de manera cuantitativa únicamente la substancia de interés en su estado inicial, excluyendo la posibilidad de que se sume cualquier respuesta debida a los productos de degradación del analito de interés o de cualquier producto de degradación de los demás componentes de la formulación.

La pérdida de la potencia o la disminución de la cantidad del analito de interés en una formulación es consecuencia de un cambio o reacción química que puede involucrar procesos de hidrólisis, oxidación, reducción o interacción principalmente.

Es importante destacar el hecho de que tanto la potencia como la efectividad terapéutica sólo pueden ser evaluadas por medio de estudios clínicos, pero dada la complejidad y costo para realizar este tipo de estudios, se han diseñado pruebas in-

vitro para simular procesos biológicos que pueden dar una idea de los parámetros farmacocinéticos.

2) Estabilidad física.

Las propiedades físicas como son la apariencia, características organolépticas (olor, color) , dureza y friabilidad, se encuentran o deben encontrarse como fueron observadas en su estado inicial.

En general, un cambio en las características físicas de un producto, es reflejo de una modificación en las características químicas. En el caso de formas sólidas es importante evaluar dureza y humedad para comprobar la eficiencia del empaque primario referido a la hermeticidad.

3) Estabilidad microbiológica.

Las características de esterilidad o resistencia al crecimiento microbiano se debe mantener dentro de límites establecidos.

Las características microbiológicas son importantes en todas las formas farmacéuticas, pero sin embargo es primordial señalar que en el caso de productos farmacéuticos inyectables, las características de esterilidad y resistencia al crecimiento microbiano son críticas.

Los agentes destinados a mantener las características microbiológicas adecuadas deben ser cuantificados y deben encontrarse dentro de los límites preestablecidos que aseguren efectividad.

4) Estabilidad terapéutica.

El efecto terapéutico del medicamento debe ser igualmente eficaz al término de la manufactura del mismo como al finalizar el periodo de vida útil.

5) Estabilidad toxicológica.

No debe existir algún indicio de toxicidad del producto, derivado de la presencia de compuestos de degradación provenientes de los principios activos o de los excipientes que constituyen la formulación.

2.2.3 Mecanismos de degradación de mayor frecuencia.

Los mecanismos de degradación que con mayor frecuencia ocurren a los productos farmacéuticos se pueden agrupar en tres tipos (20):

1) Interacción química.

La interacción química entre los componentes de una formulación es probablemente el mecanismo que en la mayor parte de los casos produce degradación de las sustancias activas o de los excipientes.

Cada caso en particular es por sí mismo un extenso tema, ya que cada formulación combina diferentes tipos y cantidades de sustancias, por lo cual solo es posible mencionar algunos puntos importantes de manera general:

a) Entre las reacciones más frecuentes se pueden mencionar por ejemplo: hidrólisis, oxidación, solvólisis, descarboxilación y reducción.

b) Las reacciones de hidrólisis y solvólisis son en general catalizadas por los ácidos y bases.

c) Los compuestos fácilmente oxidables deben evitar la combinación con compuestos iónicos.

d) Las sustancias que fácilmente tienden a presentar descarboxilación no deben ser combinados con aceptores de anhídrido carbónico, como por ejemplo las aminas.

e) Las sustancias que son de carácter ácido tienden a interaccionar con las de carácter básico.

f) Los compuestos con grupos cetónicos interaccionan con hidrazinas y sulfitos.

2) Fotólisis.

Las reacciones fotoquímicas son procesos importantes y también frecuentes en la degradación de las sustancias activas empleadas en la manufactura de medicamentos.

Casi todos los componentes activos poseen máximos de absorción en la región ultravioleta, y en menor cantidad en la región

visible, por esta razón es importante tomar en cuenta este punto al seleccionar los materiales de empaque.

El vidrio transparente para uso farmacéutico, debe ser capaz de bloquear la radiación de longitudes de onda inferior a 300 nm y el vidrio de color ámbar debe bloquear prácticamente toda la radiación correspondiente a ambas regiones.

La U.S.P (26) establece que el vidrio de color ámbar de 22 mm de espesor y capaz de no transmitir más del 18.0% de la radiación de una longitud de onda de entre 290 nm y 540 nm es adecuado para uso farmacéutico.

Los compuestos con grupos cromóforos (nitro, nitroso, cetonas, sulfonas, dobles y triples enlaces conjugados) son sensibles a la radiación y tanto mayor sea la cantidad de cromóforos presentes, será mayor la posibilidad de interacción entre los electrones móviles de cada grupo.

3) Reacciones químicas.

Las reacciones químicas también representan un extenso tema, y están directamente ligadas a los procesos de interacción. Pueden ser mencionados de manera muy general la hidrólisis, oxidación, reducción, isomerización, pirólisis, contaminación microbiana y racemización.

2.2.4 Estabilidad del clorhidrato fenilefrina.

El clorhidrato de fenilefrina es frecuentemente empleado en la elaboración de productos oftálmicos, sin embargo, el

inconveniente de dicha forma farmacéutica es la poca estabilidad que la sustancia en cuestión presenta en solución. A pH ácido, las soluciones son estables, pero conforme el pH tiende a tornarse neutro o básico, el proceso de degradación se acelera.

Se ha reportado la incompatibilidad del clorhidrato de fenilefrina con algunos compuestos, como la butacaína, agentes oxidantes, álcalis y metales pesados, sobre todo el cobre, que cuando se encuentra en concentraciones de 10 ppm acelera el proceso de degradación de la molécula (7), (10), (12).

En 1951, Schou y Rhodes demostraron que una solución inyectable de clorhidrato de fenilefrina al 1.0% es estable por un largo periodo siempre y cuando se conserve en una atmósfera libre de oxígeno y en medio ácido (12).

Como la preparación de productos oftálmicos requiere de soluciones cuyo pH no sea de carácter fuertemente ácido, se han propuesto una serie de agentes estabilizadores, ya que las soluciones sin ellos tienden a degradarse y tomar una coloración que va desde el amarillo tenue hasta el color café.

Para determinar un conservador idóneo para las soluciones de clorhidrato de fenilefrina, West y Whittet (31) diseñaron un experimento en el cual se demuestra que el etilendiamino tetracetato de sodio (E.D.T.A) actúa con mayor efectividad que cualquier otro agente estabilizador.

El experimento consistía en preparar dos soluciones de clorhidrato de fenilefrina, en la primera fase se sometió una

de las soluciones a condiciones normales de almacenaje adicionando diferentes conservadores e introduciendo una solución monitor sin conservador. Los resultados señalaron cambios físicos en la coloración de las soluciones con metabisulfito de sodio y en la solución monitor, a diferencia de la solución con etilendiamino tetraacetato de sodio.

A pesar de los cambios en las características físicas de la solución, al finalizar el estudio, se reportó que la actividad biológica permanece sin decremento.

En la segunda fase del experimento, se sometieron muestras de soluciones de clorhidrato de fenilefrina al efecto de un agente oxidante (peróxido de hidrógeno). En esta segunda parte, el etilendiamino tetraacetato de sodio también demostró ser el conservador más efectivo.

En la segunda, al igual que en la primera etapa, ninguna de las soluciones reflejó un cambio en la actividad biológica a pesar del cambio del aspecto físico de las mismas, salvo en un caso cuyo decremento fué inferior al 10.0%.

Los resultados del experimento de West y Whittet pueden observarse en las tablas III y IV.

Luduena, Snyder y Land, en 1963, realizaron una serie de experimentos, para tratar de explicar la razón de que una solución con cambios notables en las características físicas, aparentemente no implica un cambio considerable en la actividad biológica (11).

Se propuso la adrenalina como producto de degradación del

clorhidrato de fenilefrina.

La adrenalina posee el mismo efecto farmacológico que el clorhidrato de fenilefrina, pero con mayor intensidad y duración.

El experimento consiste en someter a radiación ultravioleta una solución de clorhidrato de fenilefrina, generándose un proceso de oxidación que degrada la molécula, dando origen a un cambio en el anillo de la estructura, formándose adrenalina y oxedrina.

El experimento de Luduena-Synder-Land da las bases para establecer dos puntos importantes:

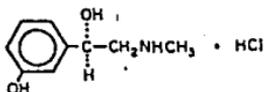
a) El primero es que el clorhidrato de fenilefrina tiende a degradarse con radiación ultravioleta, lo cual debe tomarse en cuenta para el diseño del envase primario de los productos que la contengan.

b) El segundo es que los productos de degradación formados mediante un proceso de oxidación no solo es la adrenalina, sino que también se identificó la oxedrina.

En base a éstos puntos se puede explicar el motivo por el cual las soluciones visiblemente degradadas conservan aparentemente su actividad biológica.

Al formarse adrenalina y poseer ésta un efecto farmacológico más potente, se compensa la pérdida de clorhidrato de fenilefrina y se mantiene así la actividad biológica.

CLORHIDRATO DE FENILEFRINA



OXIDACION



Adrenalina

Oxedrina

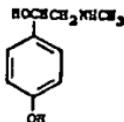
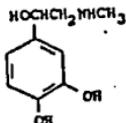


FIGURA VII. DEGRADACION DE LA FENILEFRINA POR RADIACION ULTRAVIOLETA

TABLA II
 EFECTO DEL USO DE CONSERVADORES EN SOLUCIONES DE
 CLORHIDRATO DE FENILEFRINA ALMACENADAS A TEMPERATURA AMBIENTE

EFECTO DEL USO DE CONSERVADORES EN SOLUCIONES

CONSERVADOR ADICIONADO	ASPECTO DE LA SOLUCION			
	1	3	4	6
TIEMPO DE ALMACENAJE (EN MESES)				
Ninguno	Amarillo tenue.	Amarillo con precipitado.	Cafe con deposito de color negro.	Cafe con deposito negro en las paredes del contenedor.
Metabisulfito de Sodio al 0.1Z	Rosa intenso.	Rosa-cafe intenso.	Rojo-purpura.	Cafe con deposito negro en las paredes del contenedor.
Metabisulfito de Sodio al 0.2Z	Rosa intenso.	Rojo con particulas de color negro.	Rojo-purpura con deposito de color negro.	Cafe intenso con deposito negro en las paredes del contenedor.
E.D.T.A al 0.1Z	Incolora.	Incolora.	Incolora.	Incolora.

T A B L A . III

EFEECTO DEL USO DE CONSERVADORES EN SOLUCIONES DE
CLORHIDRATO DE FENILEFRINA CON H_2O_2 A TEMPERATURA AMBIENTE

CONSERVADOR ADICIONADO	PERIODO DE ALMACENAJE EN DIAS				
	0.2	1	3	10	90
Ninguno	Rojo intenso.	Negro con abundante deposito.	Negro con abundante deposito negro en las paredes del contenedor.	Negro con deposito.	Negro con abundante deposito en las paredes del contenedor.
Metabisulfito de Sodio al 0.1%	Incolora.	Incolora.	Rosa.	Cafe intenso. contenedor.	Negro con lepriso. en las paredes del contenedor.
Metabisulfito de Sodio al 0.2%	Incolora.	Incolora.	Rosa.	Cafe tenue.	Cafe intenso.
E.D.T.A al 0.1%	Incolora.	Incolora.	Incolora.	Incolora	Incolora.

E.L Pratt (17) diseñó otro experimento para demostrar que la racemización de la molécula, es una vía de degradación poco probable de que se presente en soluciones de clorhidrato de fenilefrina cuyo pH se encuentre en el rango de 3.0 a 6.0. Pratt demostró que la proporción del isómero dextrorrotatorio no se incrementa al someter la sustancia de interés a condiciones críticas, por lo cual el porcentaje de dicho isómero depende únicamente de la cantidad inicial del mismo, excluyéndose así éste mecanismo de degradación de la molécula. Otro mecanismo de degradación estudiado, pero en formas sólidas, es la reacción entre el clorhidrato de fenilefrina y la aspirina. La interacción de éstas dos sustancias activas originan tres productos de degradación (29).

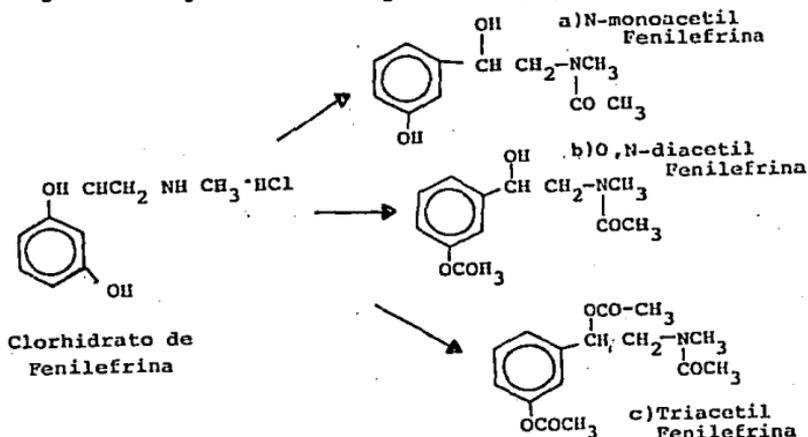


FIGURA VIII. PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL CLORHIDRATO DE FENILEFRINA EN COMBINACION CON ASPIRINA EN FORMAS SOLIDAS.

2.3 VALIDACION.

2.3.1 Generalidades de Validación.

La industria farmacéutica es sin duda una de las áreas productivas más seriamente comprometidas a mantener la calidad óptima en cada uno de los productos elaborados. Los controles existentes para asegurar la calidad adecuada y constante son estrictos y requieren de revisiones y actualización continua.

Los controles existentes abarcan todo el proceso de manufactura, desde el análisis de materia prima (tanto de activos como de excipientes), maquinaria para manufactura, materiales para acondicionamiento final y áreas de producción.

En resumen, todo cuanto involucra la manufactura de medicamentos está contemplado en los conceptos de validación.

El término de validación en general se define como el conjunto de pruebas que constituyen la evaluación crítica de la confiabilidad y reproducibilidad de toda operación o proceso relacionado con la manufactura de medicamentos.

En particular, el concepto de validación enfocado a métodos analíticos se refiere a establecer mediante pruebas experimentales realizadas en el laboratorio, que un procedimiento analítico cumple satisfactoriamente con los requisitos establecidos para poder considerarse adecuado para los fines o aplicaciones analíticas que se pretenden, es decir, que validar es evaluar la capacidad analítica del método expresada dicha capacidad en parámetros estadísticos que son: (8), (9), (13), (14), (19), (26).

- a) Especificidad y Selectividad.
- b) Precisión.
- c) Exactitud.
- d) Linealidad.
- e) Límite de detección.
- f) Límite de cuantificación.
- g) Tolerancia.

En la década de los cuarentas en algunas revistas de especialidad farmacéutica ya se hacía mención de parámetros importantes a considerar para establecer la evaluación de un método de análisis.

En la década de los setentas comienzan ya a delinearse algunos conceptos aplicables a la verificación de ensayos. Dichos conceptos se han ido perfeccionando día con día hasta llegar a los conceptos que hoy rigen la validación de métodos.



FIGURA IX. DESARROLLO DE LOS CONCEPTOS DE VALIDACION.

Algunas instituciones por su importancia a nivel internacional, han establecido los parámetros básicos que actualmente regulan los conceptos de validación enfocados a métodos analíticos.

Como ejemplo de ello se puede mencionar The United States Pharmacopeia (U.S.P) en la cual se hace referencia a la validación de métodos en la sección <1225> de la edición XXII (26).

En nuestro país, la validación de métodos es un requisito de carácter oficial ya que en la Ley General de Salud en su 5a. edición artículo 1127 se menciona:

Art. 1127.- Los establecimientos a que se refiere éste capítulo, deberán contar en su caso, con las instalaciones, equipo necesario y manual de procedimientos para efectuar los controles analíticos de materias primas, productos en proceso, preparados farmacéuticos, productos terminados y material de acondicionamiento debiéndose conservar constancia de todas las operaciones que se efectúen.

En el inciso V del mismo artículo se cita lo referente a la documentación por escrito ó validación de los puntos mencionados en el artículo:

V) Los controles deberán incluir la comprobación del resultado y la validación de cualquier técnica empleada.

Con la finalidad de unificar el criterio para validar métodos en nuestro país, El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos y el Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, han publicado la guía para validación de métodos analíticos (13).

La validación de métodos, áreas, sistemas y procesos no solo debe ser considerada desde el punto técnico ni regulatorio, en realidad, la validación también puede ser considerado desde el punto de vista económico. Inicialmente cualquier proyecto de validación supone un gasto, pero en realidad debería de considerarse como una inversión, pues al establecer por escrito el procedimiento detallado de cómo realizar cualquier operación (ya sea de manufactura o analítica) que previamente ha sido sometida a una evaluación o validación, se reducen al máximo las posibilidades de error y se amplía la posibilidad de obtener al final de toda operación o proceso un producto o resultado analítico de calidad confiable y constante.

2.3.2 Concepto de los parámetros de validación.

1) El primer parámetro a evaluar cuando se pretende validar un método analítico, es la especificidad, la cual puede ser considerado desde dos puntos de vista.

En primer término la especificidad del método con respecto a los demás componentes de la formulación, y en segundo lugar con

respecto a los productos de degradación de la substancia de interés o de los demás componentes. Al realizarse pruebas para definir la capacidad analítica con respecto a productos de degradación, se dice que si satisface los requerimientos, el método es útil para analizar muestras sometidas a estudios de estabilidad y se cataloga el método como "selectivo" (13), (26).

La especificidad del método puede definirse como la habilidad del mismo para emitir una respuesta debida únicamente a la substancia de interés, y no a los excipientes o demás activos presentes en la formulación, y es útil para fines analíticos durante el proceso de manufactura del producto o para el análisis final del mismo.

La selectividad puede definirse como la habilidad del método analítico para emitir una respuesta debida únicamente a la substancia de interés en su estado basal o inicial y no a ningún otro componente de la formulación ya sea excipiente o principio activo, ni a los productos de degradación de los mismos o de la propia substancia de particular interés (13), (20), (26).

2) La precisión del método se define como el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente sobre una muestra homogénea. La precisión puede ser medida por dos vías. La primera denominada repetibilidad, que expresa la precisión

como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de operación.

La segunda se denomina reproducibilidad y expresa la precisión como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones de operación diferentes (variando día, analista, equipo o instrumento, marca de reactivos) (13), (14), (26).

3) La exactitud se define como el grado de concordancia entre el valor experimental y el valor de referencia (13), (14), (26).

4) La linealidad del método se define como la capacidad del método para emitir una respuesta directamente proporcional a la concentración de la sustancia de interés, dentro de un rango determinado (13), (14), (26).

5) El límite de detección se define como la cantidad mínima que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada (8), (9), (13), (14), (26).

6) El límite de cuantificación se define como la mínima concentración a la cual puede ser determinada el análisis de interés, con niveles aceptables de exactitud y precisión (8), (9), (13), (14), (26).

7) La tolerancia se define como el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos por el análisis de diferentes porciones de una muestra homogénea, con la introducción de variables a las condiciones normales de operación. Esto se realiza para determinar qué tan flexible es el método o detectar cuales son los puntos críticos a cuidar durante el análisis (26).

2.3.3 Determinación experimental y criterios de aceptación.

1) Para determinar la especificidad, es necesario preparar un lote piloto de concentración conocida y un lote placebo. El método analítico se aplica por separado tanto a lote piloto como a placebo. La respuesta obtenida del análisis del lote piloto debe ser de 100.0% del valor teórico (o muy cercano), mientras que el valor resultante del análisis del placebo debe ser de cero. En caso de que el análisis del placebo no sea cero, se debe proceder a detectar el componente que emite respuesta e implementar un tratamiento previo (ya sea de extracción, precipitación, o filtración, por ejemplo) para eliminar la interferencia. El criterio de aceptación es que la respuesta del análisis sobre placebo debe ser cero.

En cuanto a la evaluación de la selectividad, el hecho de realizar una revisión bibliográfica previa al diseño experimental de éste parámetro señalará los puntos críticos que tienden a degradar la molécula de interés.

Para evaluar éste parámetro es conveniente tener cantidades suficientes de los productos de degradación.

Se procede a preparar en cantidades suficientes muestras de placebo y lote piloto. Se realiza un ensayo inicial por triplicado (como mínimo) en cada uno de ellos.

Posteriormente, a otra porción de placebo se le añade una cantidad proporcional de los productos de degradación de la substancia de interés y se aplica el método, ésta operación también es preferente realizarla por un mínimo de tres veces. La respuesta del método al ser aplicado sobre el placebo y sobre las muestras de placebo cargado con los productos de degradación debe ser igual a cero para considerar que el método es selectivo.

En la mayoría de los casos es poco probable contar con cantidades adecuadas de cada producto de degradación de la substancia de interés. En estos casos, se realiza un análisis inicial sobre placebo y sobre lote piloto, se separan porciones de cada uno de ellos y se someten a las condiciones que (previa revisión bibliográfica) aceleran el proceso de degradación de la molécula de interés (pH, humedad, temperatura, agentes oxidantes, etc). A intervalos preestablecidos se analizan por triplicado muestras por separado de lote piloto y de placebo.

La U.S.P en la sección <1225> de la edición XXII describe que cuando no se tienen cantidades disponibles de los productos de degradación, o que se desconocen, la selectividad del método puede ser demostrada por la comparación de resultados

analíticos de las muestras en su estado inicial (6 puras) y los resultados del análisis de las mismas muestras después de ser sometidas a condiciones de degradación.

El criterio de aceptación es que al realizar el análisis del placebo, la respuesta o señal detectada debe ser igual a cero, mientras que el análisis de muestras debe reflejar un decremento en la cantidad de substancia de interés presente.

En general los resultados son expresados en porcentaje de recobro o en mg/ml (13), (26).

2) La precisión del método se determina experimentalmente preparando en cantidad suficiente lote piloto al 100.0% del valor teórico y aplicando el procedimiento para determinar la reproducibilidad o repetibilidad.

Para expresar la precisión como reproducibilidad, se toma una serie de alícuotas del lote piloto y se le aplica a cada una de ellas el método, esto debe realizarse el mismo día, por el mismo analista y bajo las mismas condiciones de operación. Se recomienda un mínimo de seis determinaciones.

Para evaluar la precisión expresada como repetibilidad, se realizan una serie de determinaciones por diferentes analistas, en distintos días.

El criterio de aceptación o de rechazo se encuentra en función de la técnica empleada en el método según lo indicado en la tabla V. (13), (26).

TABLA IV. CRITERIO DE ACEPTACION PARA LA EVALUACION DE LA PRECISION.

TECNICA EMPLEADA EN EL METODO	COEFICIENTE DE VARIACION O DESVIACION ESTANDAR
Espectrofotométrica	Igual o menor a 3.0%
Cromatográfica	Igual o menor a 2.0%
Microbiológica	Igual o menor a 5.0%
Titulación	Igual o menor a 3.0%

3) La exactitud experimentalmente puede determinarse preparando muestras que contengan el analito de interés a cinco diferentes concentraciones incluyendo el 100.0% del contenido teórico. Se sugiere por ejemplo la preparación de lotes piloto al 80.0%, 90.0%, 100.0%, 110.0% y 120.0%.

Los porcentajes máximo y mínimo de los lotes piloto preparados, se puede establecer en base a los límites de valoración permitidos en publicaciones oficiales (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicano por ejemplo).

Se toman una serie de alícuotas de cada una de los lotes preparados, se analizan con el método propuesto y se compara la cantidad detectada contra la adicionada.

Los resultados son generalmente expresados en porcentajes de recobro.

El criterio de aceptación varía de acuerdo con la técnica empleada en el método de acuerdo a lo indicado en la tabla VI.

TABLA V. CRITERIO DE ACEPTACION PARA LA EVALUACION DE LA EXACTITUD

TECNICA EMPLEADA EN EL METODO	PROMEDIO DE PORCENTAJES DE RECOBRO	COEFICIENTE DE VARIACION
Cromatografía	98.0 - 102.0 %	< 2.0 %
Titulación	98.0 - 102.0 %	< 2.0 %
Químicos y Espectrofotométricos	97.0 - 103.0 %	< 3.0 %
Microbiológicos	95.0 - 105.0 %	< 5.0 %

4) La linealidad del método experimentalmente se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos del análisis de muestras que contengan el analito de interés en concentraciones dentro de un rango determinado.

El tratamiento matemático de los datos consiste en el cálculo de la regresión lineal, la pendiente y el intercepto. La determinación analítica para cada una de las concentraciones debe ser como mínimo tres. Los criterios de aceptación son los siguientes (8), (9), (13), (19), (26):

Pendiente (m) aproximadamente = 1

Intercepto (b) aproximadamente = 0

Correlación (r^2) > 0.98

5) La determinación del límite de detección varía dependiendo de si el método emplea o no una técnica instrumental.

Cuando es empleada una técnica instrumental, algunos investigadores recomiendan multiplicar por dos o tres el nivel de ruido del instrumento y establecen como límite de detección la concentración del analito a la cual se obtenga ésta señal.

Otros investigadores recomiendan determinar la respuesta emitida por una serie de muestras "blanco", calcular su desviación estandar y multiplicar por un factor que usualmente es 2 ó 3 y establecer la concentración a la cual la respuesta es mayor a éste valor.

Para métodos que emplean técnicas no instrumentales, se preparan muestras con concentraciones bajas del analito de interés y se analizan para determinar la concentración mínima a la cual hay respuesta (8), (9), (14), (26).

6) La determinación del límite de cuantificación varía dependiendo de si el método emplea o no una técnica instrumental. Cuando es empleada una técnica instrumental, se recomienda analizar una serie de muestras de placebo, calcular la desviación estandar de la respuesta obtenida, y multiplicar por un factor que usualmente es 10; el valor resultante da una aproximación de la respuesta o señal que se producirá con la cantidad mínima cuantificable. Posteriormente se preparan una serie de muestras cuyas concentraciones disminuyan hasta determinar cual de ellas emite una señal igual o mayor al valor

calculado al analizar la serie de placebos y con ello se establece la cantidad mínima que puede ser cuantificada con niveles adecuados de precisión y exactitud.

Para métodos que emplean técnicas no instrumentales, se preparan muestras con concentraciones bajas del analito de interés y se analizan para determinar la concentración mínima a la cual hay una respuesta.

El criterio de aceptación para éste parámetro en ambos casos, es que la señal emitida a la concentración mínima establecida, debe tener niveles de precisión y exactitud de acuerdo con lo establecido anteriormente en las tablas V y VI. (8), (9), (13), (14), (26).

7) La evaluación de la tolerancia de un método se realiza con la finalidad de establecer qué tan flexible es y detectar los puntos críticos del mismo.

Experimentalmente se realiza analizando alícuotas de una muestra homogénea, variando por ejemplo marcas de reactivos, instrumento de medición, orden de adición de reactivos, temperatura y tiempo (8), (9), (14).

2.4 ESPECTROFOTOMETRIA.

2.4.1 Fundamentos de Espectrofotometría.

El método propuesto para la determinación cuantitativa del clorhidrato de fenilefrina en una solución oftálmica se basa en la formación de un complejo colorido y utiliza la técnica

espectrofotométrica. La técnica espectrofotométrica tiene su fundamento en la interacción de la materia con la radiación electromagnética (6), (22), (26). La radiación electromagnética es considerada como un campo de fuerza eléctrica asociado a un campo perpendicular de fuerza magnética, el campo eléctrico de la radiación es el que actúa recíprocamente con los electrones de la materia. Cuando la radiación electromagnética pasa por una sección de la materia, el vector eléctrico de la radiación interactúa recíprocamente con los átomos y moléculas del medio que se encuentra a su paso, presentándose así los fenómenos de absorción, reflexión, emisión o dispersión de la radiación. Gráficamente se puede representar el campo eléctrico y magnético como se muestra en la figura X.

- (E) representa el vector eléctrico.
- (H) representa el vector magnético.
- (λ) representa la longitud de onda.
- (a) representa la amplitud.

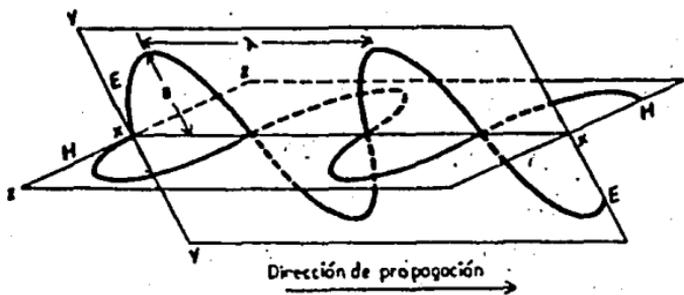


FIGURA X. REPRESENTACION GRAFICA DEL CAMPO ELECTROMAGNETICO

2.4.2 Aplicación analítica de la radiación electromagnética.

Tanto la radiación ultravioleta, visible e infrarroja tienen aplicación al análisis cualitativo y cuantitativo.

Las radiaciones ultravioleta y visible poseen suficiente energía para causar transiciones en los electrones de capas exteriores o de enlace a un nivel de mayor energía (6), (22).

Para que los fenómenos de absorción y reflexión de energía tengan aplicación analítica cuantitativa, es necesario que el método, al ser aplicado, proporcione una respuesta que se apegue a la ley de Lambert-Beer, la cual establece que la reducción de la energía radiante de un haz monocromático es proporcional a la cantidad de sustancia absorbente situado en su trayectoria.

En éste caso específico, el método de la 4-aminoantipirina se lleva a cabo mediante la absorción de la radiación en la región visible del espectro a una longitud de onda de 490 nm.

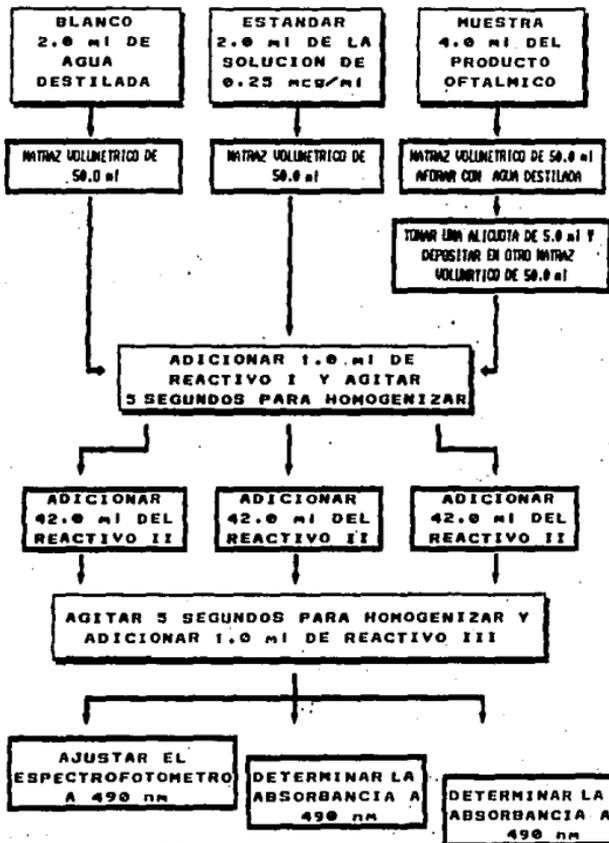
CAPITULO

III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMAS DE FLUJO.

3.1.1 Diagrama de flujo del método de la 4-aminoantipirina.

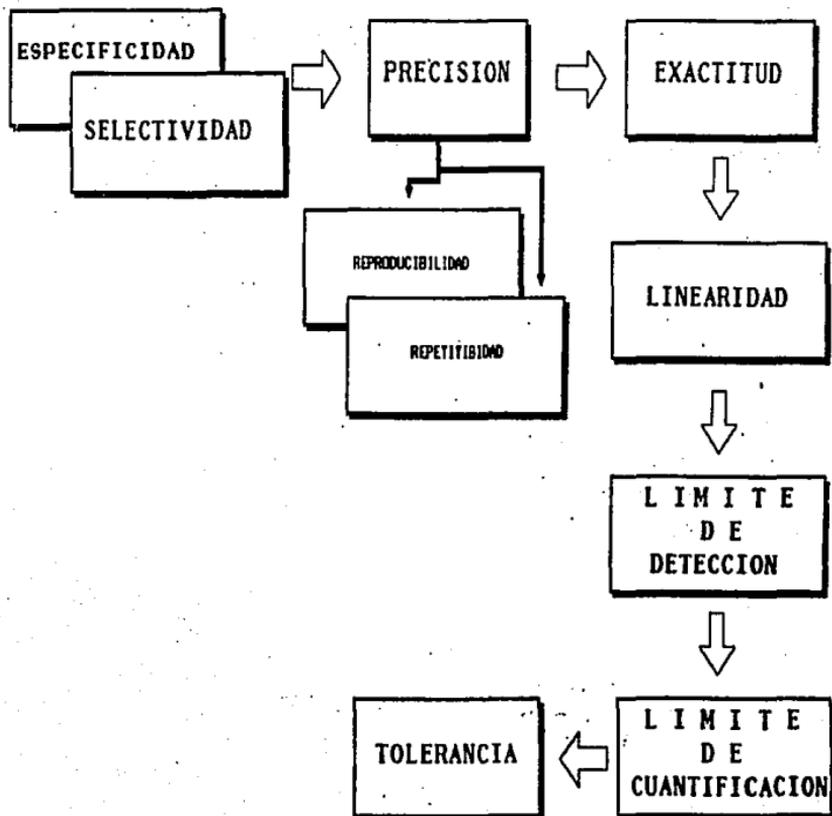


REACTIVO I: FERRICIANURO DE POTASIO AL 4.0%.

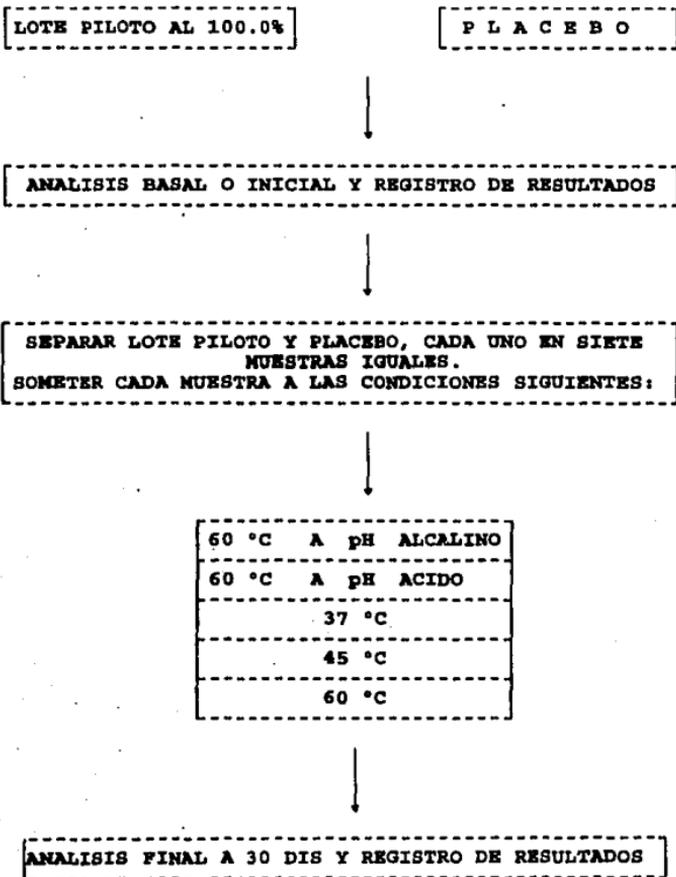
REACTIVO II: BORATO DE SODIO AL 2.0%.

REACTIVO III: 4-AMINOANTIPIRINA AL 3.0%.

3.1.2 Diagrama de flujo para la validación del método.



2.1.3 Diagrama de flujo para determinar la selectividad.



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.2.1 Material.

Matraz volumétrico de 50.0 ml	(Pyrex clase AA)
Pipeta volumétrica de 5.0 ml	(Pyrex clase AA)
Pipeta volumétrica de 4.0 ml	(Pyrex clase AA)
Pipeta volumétrica de 2.0 ml	(Pyrex clase AA)
Pipeta volumétrica de 1.0 ml	(Pyrex clase AA)
Probeta de vidrio de 50.0 ml	(Pyrex)

3.2.2 Reactivos.

Borato de sodio	$\text{Na}_2 \text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	(J.T.Baker)
Ferricianuro de potasio	$\text{K}_3 \text{Fe} (\text{CN})_6$	(J.T.Baker)
4-aminoantipirina	$\text{C}_{11} \text{H}_{13} \text{N}_3 \text{O}$	(J.T.Baker)
Clorhidrato de fenilefrina	$\text{C}_9 \text{H}_{14} \text{Cl NO}_2$	(Estandar COSUFAR)
Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2 \text{O}_2$	(J.T Baker)
Hidróxido de sodio 0.1N	Na OH	(J.T Baker)
Acido sulfúrico 0.1N	$\text{H}_2 \text{SO}_4$	(J.T Baker)

3.2.3 Equipo.

Balanza analítica	OHAUS Galaxy TM 160
Espectrofotómetro	Beckman D.U. 65
Estufa	Elecsa
Termómetro	Brad

3.2.4 Preparación de reactivos.

1) Solución primaria de clorhidrato de fenilefrina:

Pesar con exactitud 125.0 mg de clorhidrato de fenilefrina estandar de referencia en un matraz volumétrico de 50.0 ml. Disolver y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución es estable por dos meses si se conserva en refrigeración y protegida de la luz.

2) Solución estandar de clorhidrato de fenilefrina:

De la solución primaria de clorhidrato de fenilefrina, tomar una alícuota de 5.0 ml y depositar en un matraz volumétrico de 50.0 ml. Llevar a volumen con agua destilada.

3) Solución de ferricianuro de potasio al 4.0 %:

Depositar en un matraz de 50.0 ml 2.0 g de ferricianuro de potasio, adicionar 25.0 ml de agua destilada y agitar hasta disolver completamente. Llevar a volumen con agua destilada.

4) Solución de borato de sodio al 2.0 %.

Pesar 4.0 g de borato de sodio y disolver en 200 ml de agua destilada.

5) Solución de 4-aminoantipirina al 3.0 %.

En un matraz de 50.0 ml depositar 1.5 g de 4-aminoantipirina, adicionar 25.0 ml de agua destilada y agitar hasta disolver. Aforar con agua y cubrir el matraz con papel aluminio.

3.3 METODO ANALITICO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA.

El complejo colorido que se forma al reaccionar el clorhidrato de fenilefrina con la solución de 4-aminoantipirina, se ve afectado con el transcurso del tiempo con gran rapidez, por lo cual se recomienda preparar las muestras una por una, comenzando por el blanco y prosiguiendo indistintamente con estandar o muestras. El tiempo máximo que se estima por análisis para cada muestra es de un minuto.

1) Preparación del blanco:

En un matraz volumétrico de 50.0 ml depositar 2.0 ml de agua destilada, adicionar rápidamente 1.0 ml de ferricianuro de potasio al 4.0 %, teniendo cuidado de no dejar residuos de éste reactivo en las paredes del matraz. Agitar para homogeneizar la solución, adicionar 42 ml de borato de sodio al 2.0% y mezclar. Adicionar 1.0 ml de 4-aminoantipirina al 3.0% y llevar a volumen con borato de sodio al 2.0%.

Calibrar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

2) Preparación de la muestra:

Depositara una alícuota de 4.0 ml del producto oftálmico en un matraz volumétrico de 50.0 ml. Llevar a volumen con agua destilada.

En otro matraz volumétrico de 50.0 ml depositar 5.0 ml de la solución anterior, adicionar 1.0 ml de ferricianuro de potasio al 4.0%, procurando no dejar residuos del reactivo en la boca y

paredes del matraz. Agitar y adicionar 40.0 ml de borato de sodio al 2.0%. Agitar y adicionar 1.0 ml de 4-aminoantipirina al 3.0%, nuevamente agitar, y llevar a volumen con borato de sodio al 2.0%. Determinar la absorbancia a 490 nm.

3) Preparación del estandar:

En un matraz volumétrico de 50.0 ml depositar 2.0 ml de la solución estandar de trabajo, tomando las mismas precauciones que en la preparación de la muestra. Adicionar 1.0 ml de ferricianuro de potasio al 4.0%, agregar 42 ml de borato de sodio al 2.0% y agitar para homogeneizar. Adicionar 1.0 ml de 4-aminoantipirina al 3.0% y llevar a volumen con borato de sodio al 2.0%. Determinar la absorbancia de 490 nm.

3.3.1 Cálculos.

mg de clorhidrato de fenilefrina/100 ml =

$$\frac{[A_{mo} \times mgStd \times 50 \times 50 \times 5 \times 2] 100}{[A_{std} \times 4 \times 5 \times 50 \times 50 \times 50 \times 100]}$$

Simplificando los cálculos se obtiene:

mg de clorhidrato de fenilefrina/100 ml =

$$\frac{A_{Mo} \times mg Std \times \%P Std \times 0.01}{A Std}$$

Donde:

A Mo = Absorbancia de la muestra a 490 nm.

A Std = Absorbancia del estandar a 490 nm.

%P Std = Porcentaje de pureza del estandar.

mg Std = Peso en mg del estandar.

3.4 METODOLOGIA PARA LA VALIDACION.

3.4.1 El primer parámetro a evaluar es, la especificidad con respecto a placebo, y posteriormente con respecto a productos de degradación (selectividad).

Para determinar experimentalmente la especificidad, preparar una cantidad suficiente de placebo y tomar una serie de 8 alícuotas. A tres de ellas, adicionar la cantidad equivalente al 100% del valor teórico (125.0 mg/100 ml) de clorhidrato de fenilefrina.

Aplicar el método sobre cada una de las 5 alícuotas de placebo y sobre las tres de placebo cargado al 100%.

3.4.2 Para determinar la selectividad del método, es necesario realizar una revisión bibliográfica y en base a ello determinar las condiciones ambientales bajo las cuales se acelera la degradación del analito de interés, que en este caso particular es el clorhidrato de fenilefrina.

Las condiciones de degradación son siguientes:

- a) Someter las muestras a pH alcalino a 60 °C.
- b) Someter muestras al efecto de un agente oxidante (peróxido de hidrógeno) a temperatura ambiente.
- c) Adicionalmente a estas condiciones, someter muestras a 37°C, 45 °C, 60 °C y a 60 °C pH ácido.

Para evaluar la selectividad del método, preparar placebo y lote piloto (al 100.0%) en cantidad suficiente para mantener alícuotas de ambos a las condiciones antes indicadas por un periodo de 30 días.

De acuerdo con lo que se indica en el capítulo de validación de la U.S.P XXII sección <1225>, si no se cuenta con cantidades aisladas de los productos de degradación, la selectividad puede ser demostrada al realizar un análisis basal, análisis a intervalos y un análisis final a cada una de las muestras, de las cuales las que corresponden a lote piloto deben reflejar un decremento en el contenido de clorhidrato de fenilefrina con respecto a la cantidad basal.

En base a los estudios realizados por Luduena-Snyder-Land, los productos de degradación del clorhidrato de fenilefrina por oxidación son la adrenalina y la oxedrina.

Tanto la adrenalina como la oxedrina poseen un radical etilo y aminometano en posición para, lo cual, en base a lo establecido por Edgar Emerson imposibilita que se efectue la reacción entre la 4-aminocantipirina y dichas moléculas (4), (7), (29).

Las estructuras pueden observarse en la figura siguiente:

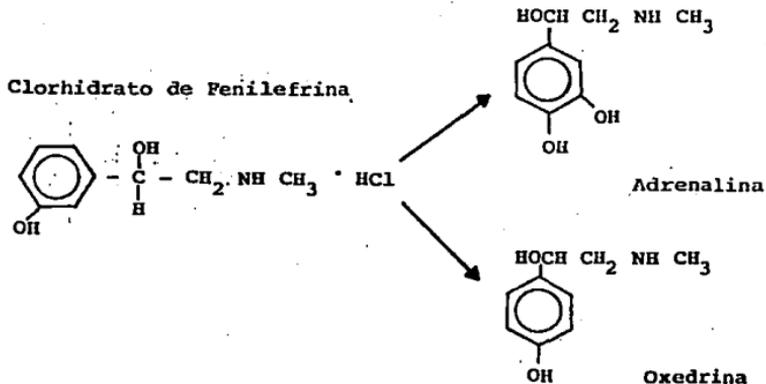


FIGURA XI. ESTRUCTURAS QUIMICAS DEL CLORHIDRATO DE FENILEFRINA, ADRENALINA Y OXEDRINA

3.4.3 Para determinar la precisión expresada como repetibilidad, preparar un lote piloto cargado al 100.0% y alizar una serie de 15 alícuotas.

Para evaluar la precisión expresada como la reproducibilidad analizar seis muestras independientes (no del lote piloto preparado anteriormente). El análisis debe realizarse por dos analistas (tres determinaciones cada uno).

3.4.4 Determinar experimentalmente la exactitud en un rango de 7.5 mg/ml (60.0 %) a 15.0 mg/ml (120.0%) del valor teórico (1.25 mg/ml). Analizar 6 muestras de cada una de las concentraciones.

3.4.5 Determinar la linealidad del método en un rango de 7.5 a 15 mcg/ml. Preparar una solución estandar y realizar diluciones para llegar a las concentraciones indicadas y analizar cinco muestras de cada una.

3.4.6 Determinar el límite de detección por las dos vías sugeridas anteriormente en el inciso 5 del punto 2.3.3, es decir, en base al nivel de ruido del espectrofotómetro Beckman DU-65, y en función de la lectura obtenida del análisis de 5 muestras placebo.

3.4.7 Para determinar el límite de cuantificación preparar una solución estandar de clorhidrato de fenilefrina y realizar diluciones hasta obtener diversas soluciones en un rango de concentraciones de 18 a 0.25 mcg/ml. Analizar 4 muestras de cada concentración.

3.4.8 Evaluar la tolerancia del método unicamente en función del tiempo de análisis ya que al realizar una revisión bibliografica se determinaron otros factores críticos.

Aplicar el método de la 4-aminocantipirina a una muestra de lote piloto (al 100.0%) y determinar la absorbancia de la misma a intervalos de 20 segundos hasta llegar a 10 minutos. Realizar esta operación tres veces, calcular el promedio para cada uno de los intervalos y graficar.

CAPITULO

IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS.

Los resultados experimentales obtenidos para la validación del método de la 4-aminoantipirina en el análisis de muestras que contienen clorhidrato de fenilefrina se presentan a continuación en una serie de tablas y gráficas.

TABLA 1. DATOS PARA LA EVALUACION DE LA ESPECIFICIDAD

NUMERO DE MUESTRA	RESPUESTA OBTENIDA (Absorbancia)
1	0.000
2	0.001
3	0.001
4	0.002
5	0.002
*6	0.703
*7	0.705
*8	0.705
PROMEDIO PLACEBOS	0.0008
* PROMEDIO MUESTRAS AL 100.0%	0.704

TABLA 2. DATOS PARA LA EVALUACION DE LA SELECTIVIDAD

CONDICION (ALMACENAJE)	ASPECTO DE LA SOLUCION		CONCENTRACION	
	PLACEBO	LOTE PILOTO	PLACEBO	LOTE PILOTO
Inicial	Solución incolora		0.0%	99.4340%
37°C por 30 días	Solución incolora		0.0%	99.5700%
45°C por 30 días	Solución ligeramente amarillenta		0.0%	99.7589%
60°C por 30 días	Color amarillo ligero	Color amarillo	0.0%	95.4589%
60°C pH alcalino 30 días	Color amarillo	Color amarillo con precipitado color café.	0.0%	52.5124%
60°C pH ácido 30 días	Ligero color paja	Color amarillo ligero	0.0%	100.6481%
Temp. ambiente 30 días con H ₂ O ₂	Color amarillo	Color café cla- ro con precipi- tado café	Si hubo respues ta.	74.8644%

**TABLA 3. DATOS PARA DETERMINAR LA PRECISION DEL METODO
EXPRESADA COMO REPETIBILIDAD.**

Numero de muestra	mg Recuperados	Porcentaje de Recobro
1	124.80	99.8464
2	123.51	98.8124
3	124.40	99.5264
4	125.83	100.6687
5	124.40	99.5264
6	123.37	98.7004
7	124.63	99.7056
8	124.27	99.4199
9	125.47	100.3827
10	124.27	99.4199
11	124.98	99.9913
12	125.43	100.3459
13	124.72	99.7781
14	124.81	99.8484
15	124.49	99.5973
Promedio	124.63	99.7046
Coef. de Variación:	0.5341	Desv. Estandar: 0.5325

**TABLA 4. RESULTADOS PARA LA EVALUACION DE LA PRECISION
EXPRESADA COMO REPRODUCIBILIDAD.**

A N A L I S T A		
	1	2
DIA 1	99.89	99.55
	100.29	99.95
	99.79	100.09
DIA 2	99.97	100.27
	99.78	99.97
	99.96	100.07
DESVIACION ESTANDAR (D.E) = 0.2063		
COEFICIENTE DE VARIACION (C.V) = 0.2064 %		

TABLA 5. DATOS PARA LA EVALUACION DE LA EXACTITUD

CONCENTRACION DEL PLACEBO CARGADO	CANTIDAD ADICIONADA EN mg	PORCENTAJE RECUPERADO (%)	PROMEDIO C.DE VARIACION DESVIACION STD
120.0 % 15.0 mg/ml	37.4	99.3416	X = 99.7671% C.V = 0.5860% D.E = 0.5846
	37.2	99.8757	
	37.4	99.4603	
	37.5	100.3787	
	37.5	100.4971	
	37.6	99.0493	
100.0% 12.5 mg/ml	31.1	99.8464	X = 99.5134% C.V = 0.7244 D.E = 0.7208
	31.2	98.8124	
	31.2	99.5264	
	31.2	100.6687	
	31.2	99.5264	
	31.1	98.7004	
80.0% 10.0 mg/ml	24.7	99.7135	X = 99.4886% C.V = 0.5476 D.E = 0.5448
	25.1	99.1795	
	25.0	100.1059	
	25.1	98.8278	
	25.0	99.0466	
	25.1	100.0588	
60.0% 7.5 mg/ml	18.6	99.6753	X = 99.6143% C.V = 0.3311% D.E = 0.3298
	18.6	99.6753	
	18.6	98.9684	
	18.6	99.9110	
	18.6	99.6753	
	18.8	99.7806	

TABLA 6. DATOS PARA LA EVALUACION DE LA LINEARIDAD.

CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD RECUPERADA
EN (mg)	EN (mg)
(60%)	
59.52	59.3267
59.52	59.3267
59.52	58.9059
59.52	59.4668
59.52	59.3267
60.16	60.0278
(80%)	
79.04	78.8134
80.32	79.6608
80.00	80.0844
80.32	79.3782
80.00	79.2371
80.32	80.3604
(100%)	
99.52	99.3670
99.84	98.6540
99.84	99.3670
99.84	100.5075
99.84	99.3670
99.52	98.2265
(120%)	
119.68	118.8918
119.04	118.8918
119.68	119.0339
120.00	120.4544
120.00	120.5964
120.32	119.1760
PENDIENTE (m) = 0.9986	
ORDENADA AL ORIGEN (b) = 0.2260	
COEFICIENTE DE REGRESION (r) = 0.9999	

GRAFICA 1. LINEARIDAD DEL METODO.

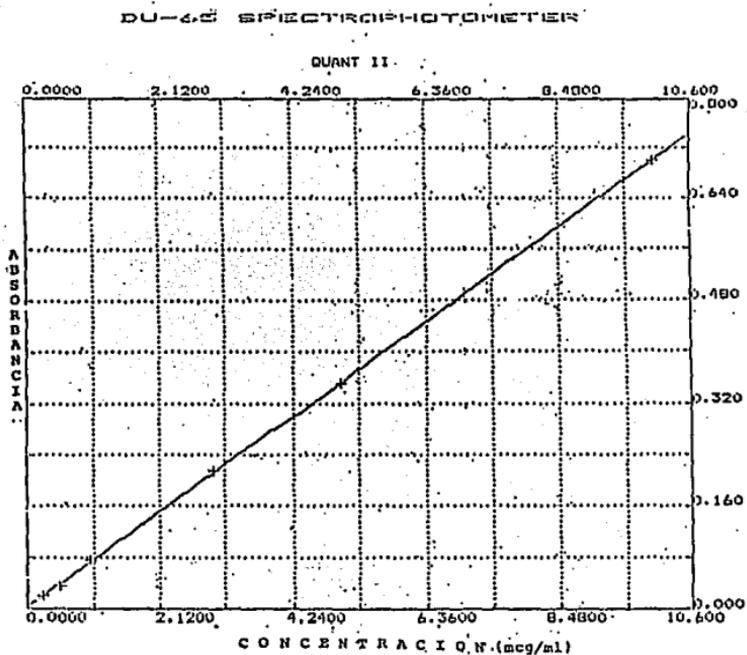


TABLA 7. DATOS PARA LA EVALUACION DEL LIMITE DE DETECCION EN BASE AL NIVEL DE RUIDO.

Nivel de Ruido Espectrofotómetro Beckman DU-65	0.0005 Abs.
-----	-----
Calculo del limite	Nivel de Ruido x 3
-----	-----
Limite de detección teórico (calculado)	0.0005 x 3 = 0.002
-----	-----
Limite de detección experimental	Concentración mínima a la cual la respuesta sea mayor a 0.002 Abs = A 0.25mcg/ml Abs = 0.021

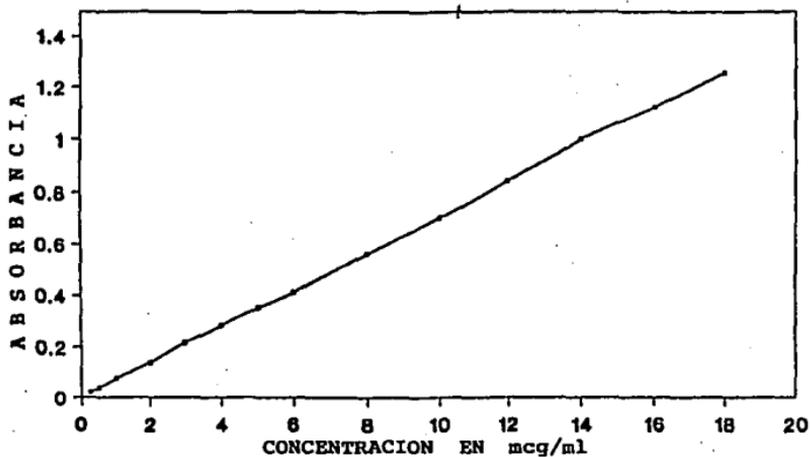
TABLA 8. DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION EN BASE A LA RESPUESTA DEL BLANCO.

PLACEBO	ABSORBANCIA
-----	-----
1	0.000
2	0.001
3	0.001
4	0.000
5	0.002
-----	-----
DESVIACION ESTANDAR	8.366×10^{-4}
-----	-----
LIMITE CALCULADO	(8.366×10^{-4}) $\times (10) = 0.008$
-----	-----
LIMITE EXPERIMENTAL: Concentración mínima con respuesta mayor de 0.008 0.25 mcg/ml = 0.21 Abs	

TABLA 9. DATOS PARA DETERMINAR EL LIMITE DE CUANTIFICACION.

X CONCENTRACION EN mcg/ml	A B S O R B A N C I A			
	Y1	Y2	Y3	Y4
0.25	0.020	0.022	0.020	0.019
0.50	0.037	0.035	0.038	0.038
1.00	0.075	0.077	0.074	0.074
2.00	0.140	0.140	0.141	0.139
3.00	0.215	0.215	0.216	0.214
4.00	0.281	0.280	0.281	0.282
5.00	0.351	0.351	0.351	0.351
6.00	0.410	0.411	0.409	0.410
8.00	0.561	0.561	0.561	0.561
10.00	0.700	0.704	0.700	0.699
12.00	0.838	0.836	0.840	0.838
14.00	0.999	0.999	0.998	0.999
16.00	1.119	1.118	1.119	1.120
18.00	1.256	1.255	1.256	1.257
VALOR EXPERIMENTAL		VALOR LIMITE		
F r = 4.3483		7.31		
F fa = 0.2462		2.21		

GRAFICA 2. LIMITE DE CUANTIFICACION.



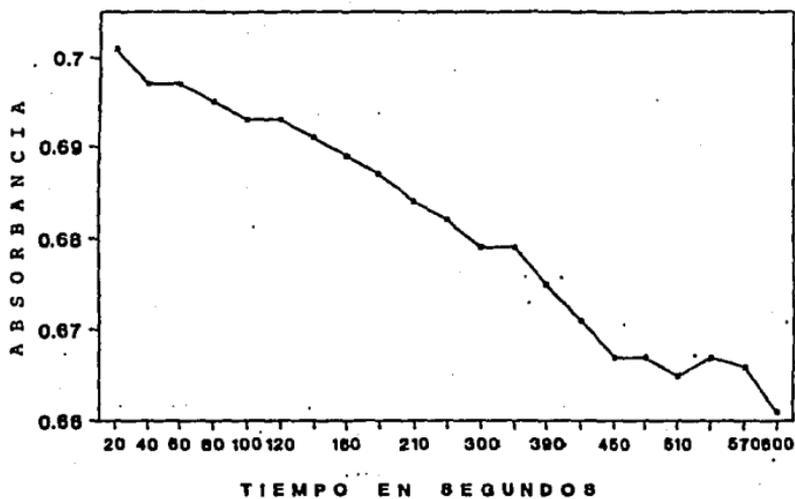
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 10. DATOS PARA EVALUAR LA TOLERANCIA

EN FUNCION DEL TIEMPO

ABSORBANCIA	TIEMPO (segundos)
0.701	20
0.697	40
0.697	60
0.695	80
0.693	100
0.693	120
0.691	140
0.689	160
0.687	180
0.684	210
0.682	240
0.679	300
0.679	360
0.675	390
0.671	420
0.667	450
0.667	480
0.665	510
0.667	540
0.666	570
0.661	600

GRAFICA 3. REPRESENTACION DE LA ABSORBANCIA
EN FUNCION DEL TIEMPO.



CUADRO 1. COMPARACION DE VALORES LIMITE Y RESULTADOS OBTENIDOS.

PARAMETRO	VALOR LIMITE	VALOR EXPERIMENTAL																									
ESPECIFICIDAD	LA SENAL EMITIDA POR EL PLACERO DEBE SER IGUAL A CERO.	LA SENAL EMITIDA POR EL PLACERO ES IGUAL A CERO.																									
SELECTIVIDAD	AL ANALIZAR EL PLACERO SOMETIDO A CONDICIONES DE DEGRADACION, LA RESPUESTA DEBE SER CERO. AL ANALIZAR LAS MUESTRAS SOMETIDAS A CONDICIONES DE DEGRADACION, LOS % DE RECOBRRO DEBEN SER MENORES AL 100 % DE ACUERDO A LA DEGRADACION PRODUCCION.	AL ANALIZAR EL PLACERO, LA RESPUESTA FUE DE CERO. LOS % DE RECOBRRO DE LAS MUESTRAS REFLEJAN UNA DISMINUCION DE LA CANTIDAD DE ANALITO DE INTERES EN ESTADO INICIAL, Y SE ENCUENTRAN DE ACUERDO A LO ESPERADO.																									
REPEATIBILIDAD PRECISION REPRODUCIBILIDAD	PARA LA PRECISION EXPRESADA COMO REPEATIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD, SEGUN LA TECNICA (ESPECTROFOTOMETRIA) EMPLEADA EN EL METODO, EL COEFICIENTE DE VARIACION DEBE SER MENOR O IGUAL A 3.0 %. EL ANALISTA NO DEBE INFLUIR EN EL RESULTADO DE LA VALORACION.	REPEATIBILIDAD: COEF. DE VARIACION = 0.5341 % DE RECOBRRO = 99.7046 % REPRODUCIBILIDAD: COEF. DE VARIACION IGUAL O MENOR A 3.0 %. SEGUN EL ANALISIS DE VARIANZA, EL ANALISTA NO REPRESENTA EFECTO EN LA VALORACION																									
EXACTITUD	EN EL RANGO QUE SE DETERMINE, EL COEFICIENTE DE VARIACION DEBE SER MENOR A 3.0%, EL % DE RECUPERACION DE 97.0 A 103.05 %, Y LA T CALCULADA DEBE SER MAYOR O IGUAL A LA T EXPERIMENTAL.	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>120%</th> <th>100%</th> <th>80%</th> <th>60%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tc</td> <td>2.571</td> <td>2.571</td> <td>2.571</td> <td>2.571</td> </tr> <tr> <td>Temp</td> <td>0.975</td> <td>1.653</td> <td>2.729</td> <td>2.864</td> </tr> <tr> <td>C.V</td> <td>0.586</td> <td>0.724</td> <td>0.547</td> <td>0.331</td> </tr> <tr> <td>/REC</td> <td>99.76</td> <td>99.51</td> <td>99.48</td> <td>99.61</td> </tr> </tbody> </table>		120%	100%	80%	60%	Tc	2.571	2.571	2.571	2.571	Temp	0.975	1.653	2.729	2.864	C.V	0.586	0.724	0.547	0.331	/REC	99.76	99.51	99.48	99.61
	120%	100%	80%	60%																							
Tc	2.571	2.571	2.571	2.571																							
Temp	0.975	1.653	2.729	2.864																							
C.V	0.586	0.724	0.547	0.331																							
/REC	99.76	99.51	99.48	99.61																							
LINEARIDAD	PONDIENTE (m) APROX. O IGUAL A 1 INTERCEPTO (b) CERCANO A CERO CORRELACION (r ₂) MAYOR DE 0.98	PONDIENTE (m) = 0.998 INTERCEPTO (b) = -0.2 CORRELACION (r ₂) = 0.9999																									
LIMITE DE DETECCION	EN BASE AL NIVEL DE RUIDO DEL INSTRUMENTO Y AL VALOR PRODUCIDO POR EL BLANCO, EL LIMITE DE DETECCION ES LA CONCENTRACION A LA CUAL SE PRODUCE UN VALOR MAYOR A 0.002 Abs.	EL METODO QUE SE PROPUES TO (DE LA 4-AMINO ANTIPIRINA) PUEDE DETECTAR CONCENTRACIONES DE 0.5 ppm PRODUCIENDO UN VALOR DE Abs. DE 0.037.																									
LIMITE DE CUANTIFICACION	CONCENTRACION MINIMA A LA CUAL SE PRODUCE UNA RESPUESTA CON NIVELES ACCEPTABLES DE EXACTITUD Y PRECISION CUMPLIENDO CON LOS VALORES CRITICOS ESTABLECIDOS, Y ADENAS DEMOSTRANDO QUE LAS RESPUESTAS OBTENIDAS DENTRO DEL RANGO DETERMINADO, SON DIRECTAMENTE PROPORCIONALES A LA CANTIDAD DEL ANALITO DE INTERES. (ES DECIR QUE SE APEGA A LA LEY DE BEER).	ES POSIBLE DETERMINAR CANTIDADES DESDE 0.25 mg/ml HASTA 18 mg/ml CON NIVELES ACCEPTABLES. Fr exp = 4.3483 Fr cal = 7.31 Ffa exp = 0.246 Ffa cal = 2.21 SE CONCLUYE EXISTE UNA RELACION ALTAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE CANTIDAD ADICIONADA Y PROPIEDAD MEDIDA Y NO HAY FALTA DE AJUSTE (SE APEGA A LA LEY DE BEER).																									

4.2 DISCUSION.

De acuerdo con los resultados del cuadro 1, el método analítico de la 4-aminoantipirina cumple con los criterios establecidos para la validación de métodos.

En el caso de la evaluación de la selectividad del método, al analizar el placebo en presencia de un agente oxidante se obtiene una respuesta que se explica de la manera siguiente:

El método se lleva a cabo en dos etapas, en la primera, el clorhidrato de fenilefrina reacciona con la 4-aminoantipirina.

En la segunda, la 4-aminoantipirina que no se combina con el clorhidrato de fenilefrina, al encontrarse en un medio alcalino se oxida y se produce una coloración roja. Para la evaluación de la selectividad se empleo peróxido de hidrógeno como agente oxidante, pero en la practica es claro que no existe la posibilidad de que un placebo por si mismo de respuesta al método.

En la evaluación de la exactitud, se observa que el valor de T_{cal} es menor a T_{exp} , para para la concentración del 60.0%.

En este caso, el resultado no es representativo, ya que al realizar el análisis de datos se observa que al efectuar los cálculos, la serie de datos para el 60% presenta una desviación estandar muy baja, y al dividir entre ella para obtener la T_{exp} , el valor calculado es mayor. Esto puede corregirse realizando un mayor numero de determinaciones para incrementar la desviación estandar, pero dado que cumple con los requisitos de coeficiente de variación y porcentaje de recuperación esta-

blecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos publicada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, se considera que el método es exacto.

CAPITULO

V

CONCLUSIONES

1) El método de la 4-aminoantipirina cumple con los requisitos establecidos para poder considerarse adecuado para la determinación analítica del clorhidrato de fenilefrina, tanto en análisis durante el proceso de manufactura como en estudios de estabilidad.

2) El método descrito satisface las necesidades de bajo costo, aplicación y reducido tiempo de análisis solicitado por la empresa.

3) La vía de degradación más probable a presentarse en el clorhidrato de fenilefrina que contiene la formulación del producto oftálmico en estudio es la oxidación de la molécula. Los productos de degradación por oxidación son la Adrenalina y la Oxedrina. Estos compuestos no pueden ser detectadas por el método propuesto.

4) Es conveniente llevar a cabo un estudio adicional, ya que de este trabajo se concluye que el conservador empleado actualmente en la formulación no es el más adecuado.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Clark A. Kelly y Morris E. Aurebach. Ion exchange separation and colorimetric determination of Phenilephrine in farmaceutical products. J. Am. Pharm. Assoc. 39 (6) 90-93 (1961).
- 2) Clarke E.C. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS. London Press. Ed. 25. (1971).
- 3) Chafetz Lester. Sensitive Ultraviolet spectrophotometric determination of some Phenethanolamine drugs. J. Pharm. Sci. 52 (12) 1193-5. (1963).
- 4) Emerson Edgar. A new color tets for phenolic compounds. J. Org. Chem. 8, 417 - 427 (1943).
- 5) FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 5a.Ed.
- 6) Fritz S.J. QUIMICA ANALITICA CUANTITATIVA. Edit. Limusa. México. (1968).
- 7) Gaglia Charles A. ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES. Academic Press. New Jersey, London. Tomo III (1973).
- 8) Guerra Johnny. Validation of analytical methods by FDA laboratories. PHARMACEUTICAL TECHCOLOGY. U.S.A.
- 9) K. Taylor Jhon. Validation of analytical methods. ANALYTICAL CHEMISTRY. Washintong. 55 (6). (1983).
- 10) Litter Manuel. FARMACOLOGIA. Ed. 9a. Edit. El Ateneo. Argentina. (1984).
- 11) Luduena F. P, Ann L. Snyder y A. M Lands. Efect of Ultraviolet irradiation oh Phenilephrine solutions. J. Pharm. Pharmacol. 15, 538-43. (1963).

- 12) Martindale. THE EXTRA PHARMACOPOEIA. Edit. by J. E. F Reynolds. Ed. 29. 1473-75. (1989).
- 13) METODOS ANALITICOS VALIDACION. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Mexico.
- 14) Nally Jhoseph. Validation guidnes industry's perspective. Pharmaceutical Engineering. (1984).
- 15) Ochinsky F.W., The Absortimetric determination of Phenol. Analyst, 85, 278. (1960).
- 16) OFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. Published by the Association of Official Analytical Chemist. Washintong, 1984.
- 17) Pratt E.L. The quantitative measurement of 1-Phenilepryne Hydrochloride in dilute aqueous solution. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. 46, 505. (1957).
- 18) R. Lane Jhonnatan. Automated colorimetric determination of Phenileprhine using 4-aminoantipyryne. Journal of Pharm. Sci. 54, (3) 596-99. (1971).
- 19) Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. México. (1986).
- 20) Sbarbati Nudelman Norma. ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina (1975).
- 21) Schrifman Hebert. Analysis of Phenyleprhine and Tetracaine by filter paper chromatography. J. Am. Pharma. Assoc. Vol XLVIII 2 111-13. (1959).

- 22) Skoog Douglas A. - West Donald M. ANALISIS INSTRUMENTAL. Edit. Interamericana. México (1983).
- 23) Stobel A.H. INSTRUMENTACION QUIMICA. Edit. Limusa. México. (1968).
- 24) Tatsuzawa M. y S. Hashiba. Analysis of mixed pharmaceutical preparations. Bunseki Kagaku. 17 (4). 478-82. (1968).
- 25) THE INDEX MERCK. Published by Merck and Co. Ed. 13. U.S.A (1983).
- 26) THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. Mack Printing Company. Ed XXII. U.S.A. 1688-89, 1703-05, 1710-12. (1990).
- 27) Thomas Koshy M., H. Mitchner. Colorimetric determination of Phenilephrine using 4-Aminoantipirine. Journal of Pharm Sci. 52, 802-03. (1963).
- 28) Thomas L.C. COLORIMETRIC CHEMICAL ANALYTICAL METHODS. Ed. London Press. 9. 61, 62. (1980).
- 29) Troup A.E. y H. Mitchner. Degradation of Phenilephrine Hydrochloride in tablet formulations containing Aspirin. J.Pharm.Sci. 52 (3), 259-63. (1963).
- 30) Weiss Frederick T. DETERMINATION OF ORGANIC COMPOUNDS METHODS AND PROCEDURES. 10, 32. (1975).
- 31) West G.B. y T.D Whittet. A note of stability of solutions of Phenylephrine. J. Pharm. Pharmacol. 12 Suppl 1137-115 T. 39 (6). (1960).