Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Desarrollo y validación de una técnica analítica por HPLC para calificar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Jhonnel Williams SAMANIEGO JOAQUIN

ASESOR

Gladys Constanza ARIAS ARROYO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Samaniego J. Desarrollo y validación de una técnica analítica por HPLC para calificar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2016.

1323

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

7
63

Siendo las **12:30 hrs. del 04 de noviembre del 2016** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre e integrado por los siguientes miembros: Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo (Asesora), Dra. Gladys Martha Delgado Pérez, Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa y la Dra. Norma Julia Ramos Cevallos; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANÁLITICA POR HPLC PARA CALIFICAR LA EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA *IN VITRO* DE CUATRO MEDICAMENTOS CONTENIENDO PARACETAMOL, CLORFENAMINA MALEATO Y FENILEFRINA CLORHIDRATO EN TABLETAS** presentado por el Magíster en Ciencia Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética **JHONNEL WILLIAMS SAMANIEGO JOAQUIN.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

MUY BUENO – 18

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Ciencia Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética **JHONNEL WILLIAMS SAMANIEGO JOAQUIN**, el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 13.45 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 13.45 hrs. del 04 de noviembre 2016.

Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre (P.P.,T.C. 40H)
Presidente

Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo (P.P.,T.C. 40H)
Miembro - Asesora

Dra. Gladys Martha Delgado Pérez (P.Asoc.,T.P. 20H)
Miembro

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa (P.Aux. T.C.)
Miembro

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P. Aux.T.C.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfonos (511) 3281811 / 6197000 - 4812 / 3284737 - 25
E-mail: upgfyb@unmsm.edu.pe

DEDICATORIAS

A Dios, que guía nuestras vidas, nos protege, inspira e impulsa para seguir adelante

A la memoria de mi madre Mery y mi padre Gleto, que siempre me alentaron y serán un ejemplo de trabajo y perseverancia y que me estarán viendo desde el cielo.

A mi amada esposa Jenny, por todo su amor y comprensión además del apoyo incondicional en la realización de esta tesis

A mi querido hermano Miguel Angel por su apoyo y comprensión

A mi asesora: La Doctora Gladys Arias por su incondicional labor docente y guía en la realización de esta tesis

INDICE GENERAL

Página

RESUMEN
ABSTRACT

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN
1.1. Situación problemática 1
1.2. Formulación del problema 2
1.3. Justificación teórica 2
1.4. Justificación práctica 2
1.5. Hipótesis 3
1.5.1. Hipótesis general 3
1.4.2. Hipótesis específica 3
1.6. Objetivos 3
1.6.1. Objetivo general 3
1.6.2. Objetivos específicos 4

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 5
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación 5
2.2. Antecedentes de la investigación 6
2.3. Bases teóricas 8

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 17
3.1. Tipo y diseño de investigación 17
3.2. Población de estudio 17
3.3. Unidad de análisis 18
3.4. Tamaño de muestra 18
3.5. Selección de muestra 18
3.6. Entidad donde se realizó la investigación 18
3.7. Método 18
3.7.1. Desarrollo del método analítico 19
3.7.2. Técnica de recolección de datos 20

3.7.3. Descripción de los procedimientos a realizar 21
3.8. Reactivos 25
3.9. Equipos 25

CAPÍTULO IV. RESULTADOS 26
4.1. Validación de la metodología 26
4.2. Comparación de los perfiles de disolución 33

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 43

CONCLUSIONES 46

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

ANEXOS 51

RESUMEN

Objetivo: desarrollar y validar un método analítico por HPLC para la calificación de equivalencia farmacéutica *in vitro* de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas.Se desarrolló y validó el método por cromatografía liquida de alta resolución. Se cuantificaron perfiles de disolución y compararon por método estadístico modelo independiente, factor de diferencia (f1) y de similitud (f2). **Resultados:** se determinó que el método es específico para cada principio activo en los tres medios de disolución. Lineal coeficientes de correlación (r) ≥ 0,99, coeficientes de determinación (r2) ≥ 0,98 y coeficientes de variación (CVf) ≤ 2 %. Exacto con recobros de cada principio activo % R = 98 a 102 y % CVR total ≤ 2. Preciso, evaluando seis muestras la repetibilidad con desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) ≤ 4,0 % y robusto evaluando muestras después de 24 horas la desviación estándar relativa (DSR) ≤ 2%. Los perfiles de disolución por método estadístico (f1) y (f2), revelando curvas de disolución distintas entre el producto de referencia y dos productos de estudio, con f1 y f2 fuera de rangos establecidos en dos de las cuatro formulaciones evaluadas. **Conclusiones:** se desarrolló el método analítico propuesto con buena separación cromatografíca. Es específico porque no detectó interferencia ni productos de degradación; es lineal para concentraciones de 50 a 150 % de cada principio activo; es veraz porque su capacidad analítica cercana al valor real, diferencia significativa en la recuperación a pH 1,2; 4,5 y 6,8; es preciso, grado de concordancia al 100 % de concentración, resultados repetitivos y precisión intermedia con CV total menores al 4%; es robusto, sin diferencia significativa con resultados trabajando muestras al inicio y después de 24 horas con DSR menores al 2%. Los perfiles de disolución de las cuatro formulaciones y el producto de referencia fueron evaluados por por el método estadístico modelo independiente, f1 y f2. Los resultados demostraron que dos de los cuatro productos analizados no serían equivalentes farmacéuticos.

Palabras clave: equivalencia *in vitro*, validación, cromatografía liquida de alta resolución, perfil de disolución, factor de diferencia (f1), factor de similitud (f2).

ABSTRACT

Objective: To develop and validate an analytical HPLC method for qualification of pharmaceutical equivalence in vitro paracetamol containing four drugs, chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride tablets. It was developed and validated the method by high resolution liquid chromatography. Dissolution profiles were quantified and compared by statistical method independent model, difference factor (f1) and similarity (f2). **Results:** It was determined that the method is specific for each active substance in the three dissolution media. Linear correlation coefficients (r) ≥ 0.99, coefficients of determination (r2) ≥ 0.98 and coefficients of variation (CVF) ≤ 2%. Accurate with recoveries of each active ingredient% R = 98-102 and ≤ 2% Total Precise CVR, evaluating six samples with robust repeatability standard deviation (S), coefficient of variation (CV) ≤ 4.0% and evaluating samples after 24 hours relative standard deviation (RSD) ≤ 2%. Dissolution profiles were compared by statistical method (f1) and (f2), revealing different dissolution curves between the reference product and research products, with f1 and f2 outside ranges set in two of the four formulations tested. **Conclusions:** The proposed analytical method was developed, good chromatographic separation; specific, did not detect interference or degradation products; linear at concentrations of 50 to 150% of each active ingredient; accurate, near real value, with no significant difference in recovery at pH 1.2 analytical capacity; 4.5 and 6.8; necessary degree of concordance 100% concentration, repeatable results and intermediate precision with total CV less than 4%; It is robust, with no significant difference with results working samples at baseline and after 24 hours with less than 2% RSD. Dissolution profiles of four formulations and the reference product evaluated by f1 and f2 independent model method. Results showed that two of the four products tested not be pharmaceutical equivalents.

Keywords: Equivalence in vitro, validation, high resolution liquid chromatography, dissolution profile, difference factor (f1), similarity factor (f2).

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

Tradicionalmente los estudios de bioequivalencia, han constituido el tipo de evidencia de primera elección para demostrar intercambiabilidad de la mayoría de los medicamentos. Sin embargo, entidades internacionales como la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (European Medicines Agency) han abierto la puerta a la posibilidad de demostrar equivalencia *in vitro* para ciertos medicamentos, mediante ensayos de disolución que presuponen eficacia y seguridad y, así, evitar la realización de ensayos *in vivo* en humanos, disminuyendo los costos de los medicamentos.

Se podrá utilizar este tipo de estudios *in vitro* cuando no es un fármaco con índice terapéutico estrecho, exhibe una farmacocinética lineal y efecto de primer paso menor del 70%, y si es altamente soluble en agua sobre todo en el rango de pH fisiológico (1 – 8) a 37ºC; cuando es altamente permeable en el intestino, por ejemplo cuando la extensión de la absorción es mayor a 80%. También cuando la forma farmacéutica exhibe cualidades particulares; por ejemplo, los excipientes no ejercen impacto significativo en la farmacocinética del principio activo y su liberación es rápida en buffers, sobre todo en el rango de pH fisiológico (1 – 8) a 37ºC.Para ello utilizamos las comparaciones de los perfiles de disolución del medicamento en estudio.

La cuantificación de las muestras obtenidas de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato, como medicamento antigripal en tabletas, se propone determinarlo por el método analítico HPLC ya que es más específico y sensible. El objetivo del presente trabajo es desarrollar y validar un método para calificar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas.

1.2 Formulación del problema

¿La técnica analítica por HPLC a validar puede calificar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de la combinación paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas?

1.3 Justificación teórica

En los últimos años, los ensayos de disolución se han convertido en una prueba sumamente importante para establecer la calidad de los productos farmacéuticos orales. Estos ensayos fueron, al inicio, exclusivamente una prueba de control de calidad, pero actualmente se consideran como una prueba de equivalencia de sustitución para ciertas categorías de productos farmacéuticos administrados por vía oral. Así, en ciertas circunstancias, la probabilidad de bioequivalencia entre un producto multifuente y un producto innovador puede documentarse usando enfoques *in vitro*, tales como los perfiles de disolución, para lo cual se realizará la validación de un método de ensayo analítico para poder demostrarlo.

Las materias primas provenientes de cada país, poseen diferentes impurezas o elementos traza, ya que la síntesis de estas se realizan de diversas formas y en lugares distintos. Los excipientes de una formulación, por ejemplo el disgregante juega un papel muy importante en la disolución y desintegración de una tableta.

1.4 Justificación práctica

Debido a la aparición en el mercado farmacéutico de nuevas marcas de medicamentos antigripales con la combinación de los activos: paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas, surge la necesidad de establecer parámetros comparativos con el

producto de referencia, que permitan presumir su intercambiabilidad, así como el grado, calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos comercializados en la ciudad de Lima. Para ello se desarrollará y validará un método analítico que permita determinarla equivalencia farmacéutica *in vitro* de cuatro formulaciones.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis general

La técnica analítica validada por HPLC califica la equivalencia farmacéutica *in vitro* de la combinación paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas.

1.5.2 Hipótesis específica

Los perfiles de disolución de los productos en estudio y el producto de referencia de la combinación paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato son similares.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Desarrollar y validar una técnica analítica por HPLC para la calificación de la equivalencia farmacéutica *in vitro* de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas

1.6.2 Objetivos específicos

a. Determinar los perfiles de disolución del producto de referencia y cuatro productos en estudio.
b. Establecer y comparar las diferencias de los perfiles de disolución del producto de referencia y los productos en estudio.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Los métodos cualitativos parten del supuesto básico de que el mundo social está construido de significados y símbolos. De ahí que la intersubjetividad sea una pieza clave de la investigación cualitativa y punto de partida para captar reflexivamente los significados sociales. La realidad social así vista está hecha de significados compartidos de manera intersubjetiva. El objetivo y lo objetivo es el sentido intersubjetivo que se atribuye a una acción. La investigación cualitativa puede ser vista como el intento de obtener una comprensión profunda de los significados y definiciones de la situación tal como nos la presentan las personas, más que la producción de una medida cuantitativa de sus características o conducta. (Jiménez, B., 2000)

Una de las preguntas que el investigador se hace durante toda la investigación es cómo garantizar el rigor del trabajo científico. Otra pregunta que se hace es cómo otros investigadores juzgarán el rigor de la investigación realizada. Estos cuestionamientos han generado debates entre los investigadores de los abordajes cualitativo y cuantitativo. Algunos investigadores cualitativos afirman que los cánones o estándares con que se juzgan los estudios cuantitativos son inapropiados para evaluar el rigor metodológico de los estudios cualitativos, por lo que proponen otros criterios coherentes con los propósitos, fines y bases filosóficas del paradigma que representan. (Castillo, E., Vásquez, M., 2003, p.164-167)

En este sentido, los criterios que comúnmente se utilizan para evaluar la calidad científica de un estudio cualitativo y por ende su rigor metodológico son la dependencia, credibilidad, auditabilidad y transferibilidad (Guba E., Lincoln Y. 1989) (Ruiz J., Ispizua M. 1989) (Franklin C., Ballau M. 2005) (Mertens D. 2005).

2.2 Antecedentes de investigación

Se desarrolló y valido un método analítico por HPLC preciso, exacto y sencillo para determinar simultáneamente hydralazina y dinitrato de isosorbida a granel y en tabletas por HPLC. La separación en cromatografía de las dos drogas fue conseguida en una columna cromatografica de la marca Zodíac C18 de 5µ en modo isocrático. La fase móvil de acetato de amonio 0,01M: acetonitrilo: metanol, en proporción 50:30:20 v/v y ajustado a pH 3 con ácido fosfórico y un flujo de 1mL/minuto, a una longitud de onda de 270 ŋm. Los tiempos de retención de hydralazine y dinitrato de isosorbida fueron de 2,337 y 3,413 minutos, respectivamente. Para la linealidad del método se obtuvo un coeficiente de correlación 0,994 para HYD y 0,997 para ISD en seis diferentes concentraciones para cada nivel y por triplicado en el rango de 45-105 µg/mL para hydralazina y 24-56 µg/mL para dinitrato de isosorbida. El método fue validado según las pautas de ICH y puede ser empleado para el análisis de control de calidad rutinario (Neelima, K., Rajendra, Y., 2014).

Se realizó un estudio para evaluar la disolución *in vitro* e *in vivo* de seis marcas de tabletas orales de ciprofloxacino, disponible en el mercado de los Estados Unidos de América. Los perfiles de disolución in *vitro* de los seis productos de ciprofloxacino se determinaron utilizando el método de paletas de disolución USP 38. Se llevó a cabo utilizando el modelo farmacocinético no compartimental y análisis compartimental para determinar los parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacino después de la administración oral a dosis única. La liberación *in vitro* del estudio reveló que la cantidad de ciprofloxacino liberado en 20 minutos no fue menos de 80% de la cantidad declarada, lo que está de acuerdo con los requisitos de farmacopea. Todos los productos ensayados se consideran de disolución muy rápida con excepción de dos fórmulas. La concentración plasmática de ciprofloxacino se adapta mejor a un modelo abierto de dos compartimentos. La biodisponibilidad más baja se determinó que era 93,24%, mientras que la más alta 108,01%. La

vigilancia posterior a la comercialización es muy importante para garantizar la calidad del producto y la eliminación de productos de calidad inferior a distribuir y en consecuencia, garantizar una mejor evolución clínica del paciente. Los productos genéricos de ciprofloxacino probados distribuidos en este mercado han demostrados ser de buena calidad y puede ser utilizado de forma intercambiable con el producto ciprofloxacino de marca (Fahmy, S., Abu, E., 2014).

En el estudio de equivalencia *in vitro* de ciclosporina en cápsulas de gelatina blanda, empleadas en el HNERM, se buscó demostrar la equivalencia *in vitro* entre dos marcas diferentes de ciclosporina, mediante la comparación de los perfiles de disolución,el mismo que se justifica por el proceso de solubilización de las cápsulas de ciclosporina microemulsión; tomando como referencia la metodología establecida en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 32), así como los parámetros establecidos por la FDA (Food and Drug Administration), OMS(Organización Mundial de la Salud) y EMA (European Medicine Agency). Los resultados obtenidos mostraron una diferencia significativa en los porcentajes de disolución de las dos formulaciones de ciclosporina, lo cual evidencia que el producto de referencia y el producto en estudio tienen un comportamiento físico-químico diferente que puede deberse a cambios en la formulación y la solubilidad (Aliaga, R., Pozo, T., 2010)

En el estudio de equivalencia terapéutica de tabletas de diazepam dispensadas en la ciudad de Ica, Perú, se busco determinar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de tres formulaciones de diazepam 10 mg tabletas, para establecer su intercambiabilidad con el medicamento de referencia, innovador. Se determinaron los perfiles de disolución en medios similares a pH fisiológicos del organismo según lo señalado por la OMS (Reporte Técnico 937). Para establecer la equivalencia farmacéutica se empleó el factor de similitud (f2), considerando que dos formulaciones son equivalentes farmacéuticos *in vitro* si los valores están comprendidos entre 50 y 100. Se obtuvo como resultados que los

medicamentos evaluados presentaron a pH 1,2 disolución muy rápida, sin embargo las tres formulaciones de prueba y el de referencia a pH 4,5 y 6,8 presentaron disolución lenta con valores, f2 a pH 4,5: multifuente A (f2 = 76,0); multifuente B (f2 = 68,9); multifuente C (f2 = 30,5); y a pH 6,8: multifuente A (f2 = 60,6); multifuente B (f2 = 78,2); multifuente C (f2 =20,4). Concluyeron que según los valores f2 encontrados para las tres formulaciones de diazepam el medicamento multifuente C (nacional) no es equivalente al medicamento de referencia dado que no se pudo demostrar su intercambiabilidad, la que si se logró establecer para los medicamentos multifuente A y B (Herrera, O., Grande, M., 2012)

2.3 Bases Teóricas

Productos multifuente

Son todos aquellos medicamentos diferentes al innovador. Son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que pueden o no ser equivalentes terapéuticos. Los medicamentos multifuentes, que hayan demostrado equivalencia terapéutica frente al producto de referencia pueden ser declarados intercambiables.

Equivalentes farmacéuticos

Medicamentos que contienen la misma cantidad molar de ingrediente farmacéutico activo, en la misma forma farmacéutica, están destinados a ser administrados por la misma vía y cumplen con estándares de calidad idénticos o comparables. (Ministerio de Salud - Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas, 2014)

Ley Nº 29459, "Ley de productos farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios", Art.° 10

Para la obtención del Registro Sanitario, se requieren los estudios de intercambiabilidad, en las condiciones y prioridades que establece el Reglamento respectivo, de acuerdo a lo recomendado por la OMS. Solamente son exigibles estudios de bioequivalencia *in vivo* a los productos de riesgo sanitario alto y considerando las excepciones de acuerdo a la clasificación Biofarmacéutica, atendiendo al principio de gradualidad. (Ley 29459, 2009, Art.° 10).

Estudio*s in vitro*

Además de las pruebas de control de calidad rutinarias, se han utilizado las pruebas de disolución (estudios *in vitro*) para establecer equivalencia farmacéutica de determinados productos.

Los estudios *in vitro* están constituidos por estudios comparativos de perfiles de disolución, en donde se determina la cantidad o porcentaje del principio activo disuelta en función del tiempo bajo condiciones controladas y validadas.

El propósito de este tipo de estudio es comparar las características de liberación del principio activo contenido en una forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata (Medina, A., 2009).

En base a la solubilidad y permeabilidad de los fármacos, existe el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS):
Clase 1: Fármacos de alta solubilidad - alta permeabilidad
Clase 2: Fármacos de baja solubilidad - alta permeabilidad
Clase 3: Fármacos de alta solubilidad - baja permeabilidad
Clase 4: Fármacos de baja solubilidad - baja permeabilidad

Se puede utilizar esta clasificación como base para establecer las especificaciones de disolución *in vitro* y también puede proveer una base para predecir la probabilidad de lograr una correlación *in vivo-in vitro* (IVIVC) exitosa (Amidon, 1995).

La clorfenamina maleato se clasifica dentro de la clase 1, paracetamol y fenilefrina clorhidrato dentro de la clase 3, según la lista complementaria de ingredientes activos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006).

Perfil de disolución

Curva que caracteriza la cinética de disolución cuando se representa gráficamente la cantidad o porcentaje del medicamento disuelto en función del tiempo (Ministerio de Salud Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas, 2014).

Determinación de las características de disolución y la similitud de los perfiles de disolución del producto medicamentoso

Las pruebas de disolución deberán realizarse en un Aparato USP I a 100 rpm o un Aparato II a 50 rpm usando 900 mL de los siguientes medios de disolución: (1) 0,1 N de HCl o fluido gástrico simulado USP sin enzimas; (2) un tampón de pH 4,5 y (3) un tampón de pH 6,8 o fluido intestinal simulado USP sin enzimas. Para cápsulas y comprimidos recubiertos de gelatina, se puede usar fluido gástrico o intestinal simulado USP (con enzimas).

Los aparatos para probar la disolución utilizados en esta evaluación, deberán ceñirse a los requisitos de la USP (<711> Disolución). La selección del aparato para probar la disolución (Aparato USP I o II) durante el desarrollo del fármaco deberá basarse en una comparación

de la disolución *in vitro* y los datos farmacocinéticos *in vivo* disponibles para el producto. El aparato USP I (*método de cesta*) se prefiere por lo general para cápsulas y productos que tienden a flotar y el aparato USP II (*método de paleta)* se prefiere por lo general para los comprimidos. Para algunas formas posológicas comprimidas, la disolución *in vitro* (pero no *in vivo*) puede ser lenta debido a la manera en la cual el producto desintegrado se asienta en el fondo de un matraz de disolución. En tales situaciones, se podrá preferir el aparato USP I antes que el aparato II. Si hace falta modificar las condiciones de prueba para reflejar mejor la disolución rápida *in vivo* (p.ej., el uso de una velocidad giratoria distinta), se puede justificar tales modificaciones comparando la disolución *in vitro* con los datos de absorción *in vivo* (p.ej., un estudio de Biodisponibilidad relativa usando una solución acuosa simple como producto de referencia).

Se deberá evaluar un mínimo de 12 unidades posológicas de un producto medicamentoso para respaldar una solicitud de bioexención. Se recolectará las muestras en un número suficiente de intervalos para caracterizar el perfil de disolución del producto medicamentoso (p.ej., 10, 15, 20 y 30 minutos).

Cuando se comparan los productos de prueba y referencia, se deberá comparar los perfiles de disolución usando un factor de similitud (f2). El factor de similitud es una transformación logarítmica de la raíz cuadrada recíproca de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en el porcentaje (%) de disolución entre las dos curvas.
f2 = 50 _ log {[1+(1/n)©t=1n (Rt - Tt)2]-0,5 _ 100}

Los dos perfiles se consideran similares cuando el valor de f2 está entre 50 y 100. Para permitir el uso de datos medios, el coeficiente de variación no deberá ser más del 20% en los puntos temporales más tempranos (p.ej., 10 minutos), y no deberá ser más del 10% en los otros puntos temporales. Nótese que cuando los productos tanto de prueba como de referencia disuelven el 85% o más de la cantidad marcada del

fármaco en 15 minutos usando los tres medios de disolución recomendados; no hace falta la comparación de perfiles con una prueba de f2. (US Food And Drug Administration, 2000)

Comparación de los perfiles de disolución

Hasta hace poco, se han utilizado especificaciones y pruebas de disolución de punto único para evaluar los aumentos en escala y cambios posteriores a la aprobación; como: (1) aumento en escala, (2) cambios en el sitio de fabricación, (3) cambios en componentes y composición y, (4) cambios en equipos y procesos. Un producto cambiado también puede ser una concentración menor de un producto medicinal previamente aprobado. Ante ciertos cambios menores, la prueba de disolución de punto único puede ser adecuada para asegurar que no haya cambios de calidad y rendimiento en el producto. Para cambios más importantes, se recomienda una comparación de perfiles de disolución realizada bajo condiciones idénticas para el producto antes y después del (de los) cambio(s) (ver SUPAC-IR). Los perfiles de disolución pueden considerarse similares en razón de (1) similitud global de los perfiles y (2) similitud en cada punto temporal de disolución de la muestra. Se puede realizar la comparación de perfiles de disolución utilizando un método independiente o dependiente de modelo.

a. Enfoque independiente de modelo utilizando un factor de similitud

Un enfoque independiente de modelo sencillo utiliza un factor de diferencia (f1) y un factor de similitud (f2) para comparar los perfiles de disolución (Moore 1996). El factor de diferencia (f1) calcula la diferencia porcentual (%) entre las dos curvas en cada punto temporal y es una medida del error relativo entre las dos curvas:

f1 = {[_t=1n | Rt - Tt |]/[_t=1n Rt]}_ 100

Donde n es el número de puntos temporales, Rt es el valor de disolución de la tanda de referencia (anterior al cambio) en el tiempo t, y Tt es el valor de disolución de la tanda de prueba (posterior al cambio) en el tiempo t.

El factor de similitud (f2) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual (%) entre las dos curvas.

f2 = 50 _ log {[1+(1/n)_t=1n (Rt - Tt)2]-0.5_ 100}

A continuación hay un procedimiento específico para determinar los factores de diferencia y similitud:

(1) Determinar el perfil de disolución de dos productos (12 unidades cada uno) de los productos de prueba (posteriores al cambio) y referencia (anteriores al cambio).
(2) Usando los valores de disolución medios de ambas curvas en cada intervalo temporal, calcular el factor de diferencia (f1) y el factor de similitud (f2) usando las ecuaciones que figuran arriba.
(3) Para que las curvas se consideren similares, los valores de f1 deberán estar cerca de 0, y los valores de f2 deberán estar cerca de 100. Por lo general, los valores de f1 de hasta 15 (0-15) y los valores de f2 mayores de 50 (50-100) aseguran la igualdad o equivalencia de las dos curvas y, por lo tanto, del rendimiento de los productos de prueba (posteriores al cambio) y referencia (anteriores al cambio).

Este método, independiente de modelo, es más conveniente para la comparación de los perfiles de disolución cuando hay tres a cuatro o más puntos temporales de disolución disponibles. También deberá considerarse las siguientes recomendaciones como sugerencias adicionales para el enfoque general:

Las mediciones de disolución de las tandas de prueba y referencia deberán realizarse bajo exactamente las mismas condiciones. Los puntos temporales de disolución para ambos perfiles deberán ser los mismos (p.ej., 15, 30, 45, 60 minutos). La tanda de referencia utilizada deberá ser el producto fabricado más recientemente antes del cambio. Sólo se deberá considerar una medición después de la disolución del 85% de ambos productos.

Para permitir el uso de datos medios, el coeficiente porcentual de variación en los puntos temporales más tempranos (p.ej., 15 minutos) no deberá ser más del 20%, y en otros puntos temporales no deberá ser más del 10%.

Los valores de disolución medios de Rt pueden derivarse o de (1) la última tanda anterior al cambio (de referencia) o (2) las últimas dos tandas o más fabricadas consecutivamente antes del cambio.

b. Procedimiento de región de certeza multivariado independiente de modelo

En casos donde la variación dentro de la tanda es más del 15% de CV, conviene más un procedimiento independiente de modelo multivariado para la comparación de los perfiles de disolución. Se sugieren los siguientes pasos:

(1) Determinar los límites de similitud en términos de la distancia estadística multivariada (MSD) en base a diferencias en disolución entre las tandas en relación a las tandas de referencia (aprobadas por patrón).

(2) Calcular la MSD entre las disoluciones de prueba y referencia medias.

(3) Calcular el intervalo de certeza del 90% de la verdadera MSD entre las tandas de prueba y referencia.

(4) Comparar el límite superior del intervalo de certeza con el límite de similitud. Se considera que la tanda de prueba es similar a la

tanda de referencia si el límite superior del intervalo de certeza es igual a o menor al límite de similitud.

c. Enfoques dependientes de modelos

Se han descrito varios modelos matemáticos en la literatura para corresponder a los perfiles de disolución. Se sugieren los siguientes procedimientos para permitir la aplicación de estos modelos a la comparación de los perfiles de disolución:

(1) Seleccionar el modelo más apropiado para los perfiles de disolución de las tandas patrones anteriores al cambio y aprobadas. Se recomienda un modelo con no más de tres parámetros (como los modelos lineal, cuadrático, logístico, probit y Weibull).

(2) Usando los datos para el perfil generado para cada unidad, aparear los datos con el modelo más apropiado.

(3) Se fija una región de similitud basada en la variación de parámetros del modelo apareado con las unidades de prueba (p.ej., cápsulas o comprimidos) de las tandas aprobadas patrones.

(4) Calcular la MSD en los parámetros del modelo entre las tandas de prueba y referencia.

(5) Calcular la región de certeza del 90% de la verdadera diferencia entre las dos tandas.

(6) Comparar los límites de la región de certeza con la región de similitud. Si la región de certeza está dentro de los límites de la región de similitud, se considera que la tanda de prueba tiene un perfil de disolución similar a la tanda de referencia (US FDA, 2000).

Cromatografía de líquidos (HPLC)

El término cromatografía de líquidos, según se usa en los compendios, es sinónimo de cromatografía líquida de alta presión y de cromatografía líquida de alta resolución. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. (USP 38/NF33, 2015)

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

Estudio analítico experimental y comparativo, empleándose cuatro formulaciones de la combinación paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato tabletas comercializados en la ciudad de Lima, con número de lotes: 071745, 1062524, 1062545, 1049615 obtenidos en establecimientos farmacéuticos los cuales fueron comparados con el original de laboratorio multinacional (medicamento de referencia Desenfriol D, Lote: A1044564).

3.2 Población de estudio

Cinco formulaciones, uno es el producto de referencia (Figura1).



Figura 1. El medicamento de referencia y cuatro formulaciones utilizadas en este estudio.

3.3 Unidad de análisis

Se procedió a validar un método de ensayo por HPLC para determinar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato tabletas.

3.4 Tamaño de muestra

Cinco: cuatro formulaciones comercializadas en Lima y el medicamento de referencia

- Producto A: lote 071745 / Saval
- Producto B: lote 1062524 / Vita pharma
- Producto C: lote 1062545 / Gabblan
- Producto D: lote 1049615 / Quilab
- Producto E: lote 4CRNA083 / Schering Plough

3.5 Selección de muestra

Se obtuvo las muestras de las cuatro formulaciones adquiriéndolas en Boticas y Farmacias que son comercializadas en la ciudad de Lima.

3.6 Entidad donde se realizó la investigación

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Investigación y desarrollo del Laboratorio Farmacéutico Medifarma S.A.

3.7 Método

Se utilizó el método HPLC para determinar la equivalencia farmacéutica *in vitro* de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato tabletas.

3.7.1 Desarrollo del método analítico

Para elegir la longitud de onda adecuada se realizó un barrido espectral de 200-900 ŋm con la ayuda de un equipo con detector de arreglo de Diodos, donde los analitos de interés fueron detectados desde la longitud de onda de 202 hasta 298 ŋm. Empleando longitudes de onda UV a 202 ŋm para fenilefrina clorhidrato, 298 ŋm para paracetamol y 205 ŋm para clorfeniramina maleato, donde presentaron las mayores absorbancias y además se pudo determinar la pureza de pico en el equipo cromatógrafico para cada analito, evidenciando su selectividad a esas longitudes de onda (Figura 2), (Figura 3)

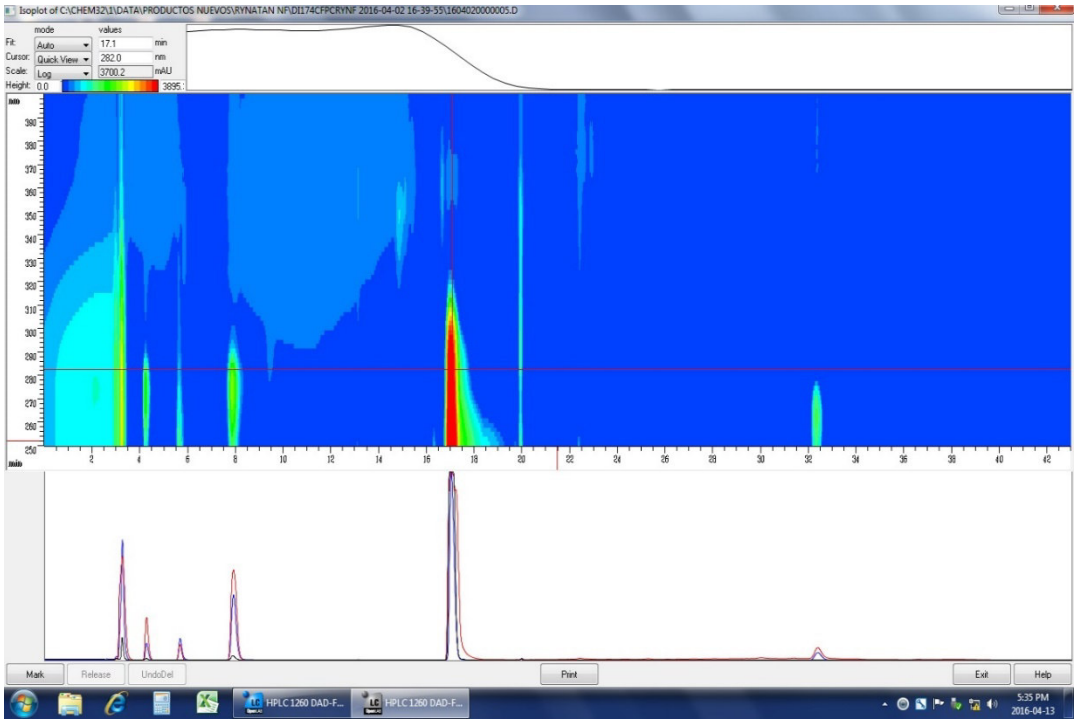


Figura 2.Gráfico de isoabsorbancia para clorfenamina maleato, fenilefrina clorhidrato y paracetamol

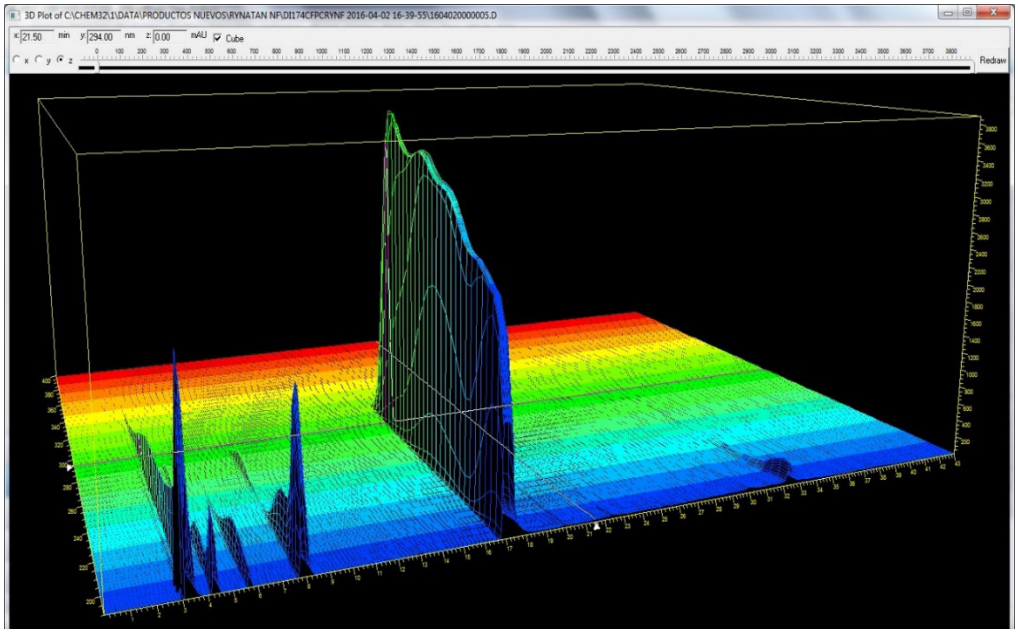


Figura 3. Gráfico de isoabsorbancia tridimensional de clorfenamina maleato, fenilefrina clorhidrato y paracetamol

Se empleó como fase móvil una solución fosfato monobásico de potasio que se ajustó a pH 3,5 con ácido fosfórico al 85%. Se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min hasta el minuto 7,0 y luego se aumentó el flujo a 1,0 mL/min hasta el minuto 22,0 de forma constante hasta el minuto 35,0; luego se disminuyo el flujo a 0,5 mL/min hasta el minuto 40,0. También se midió la gradiente de acetonitrilo a los 22,0 minutos en un 20% hasta el minuto 35,0 y luego continuo con fase móvil; la temperatura de la columna fue de 30ºC y el volumen de inyección de 20µL.

3.7.2 Técnica de recolección de datos

Se utilizó una técnica de tipo experimental con elaboración de parámetros estadísticos que reflejan la validez, objetividad y confiabilidad de la validación de este método analítico.

Los perfiles de disolución fueron cuantificadas a través de la técnica HPLC. Estos perfiles se compararon a través de un método estadístico modelo independiente, factor de diferencia (f1) y de similitud (f2).

3.7.3 Descripción de los procedimientos a realizar

a. Desarrollo y validación del método analítico

Se desarrolló un método por HPLC para la determinación de disolución en tres medios de diferente pH; para lo cual se procedió a realizar la validación del método analítico con los experimentos correspondientes para cada parámetro como: Especificidad, Linealidad, Veracidad, Precisión y Robustez (Figura 4).

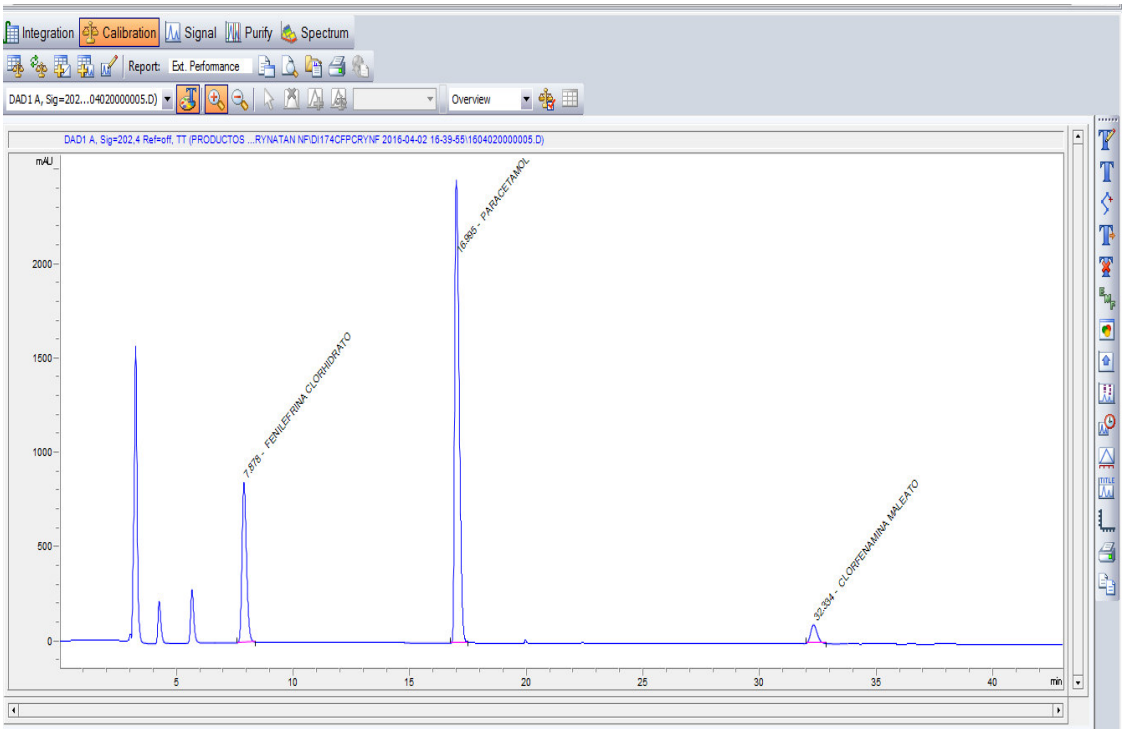


Figura 4. Cromatograma para identificar y cuantificar clorfenamina maleato, fenilefrina clorhidrato y paracetamol

a.1 Especificidad

(1) Determinación de la interferencia de excipientes: se analizó el placebo, como si fuera la muestra, cuyo resultado no debe dar una respuesta cuantificable; esto indica que los excipientes no interfieren en el análisis del analito.

Se preparó una muestra de placebo con el principio activo al 100% y se efectuó el análisis respectivo comparando la respuesta del análisis con la de un patrón puro del principio activo. Se determinó la selectividad del método midiendo el grado de interferencia obtenida por la diferencia de resultados del análisis del principio activo con y sin placebo. Los resultados obtenidos deben concordar con ± 2% del teórico.

(2) Determinación de interferencia de productos de degradación: se trató la muestra con los siguientes métodos de degradación artificial del analito:

- Hidrólisis alcalina: por calentamiento en baño María a 80 ºC con NaOH 0,1N por 2 horas y posterior neutralización con HCl 0,1N.
- Hidrólisis ácida: por calentamiento en baño María a 80 ºC con HCl 0,1N por 2 horas y posterior neutralización con NaOH 0,1N.
- Oxidación: por 2 horas en baño María con V gotas de peróxido de hidrógeno al 30%.
- Termólisis: por calentamiento de la droga en estufa a 80°C por 10 horas.
- Fotólisis: exposición en lámpara de luz UV por 3 días.

a.2 Linealidad

(1) Linealidad del sistema: se prepararon tres curvas de calibración con cinco concentraciones correspondientes al: 50, 75, 100, 125 y 150 % de la concentración teórica.

(2) Linealidad del método: se prepararon tres soluciones de placebo enriquecidos con los principios activos cada una por triplicado, que cubrían el intervalo de trabajo y por pesadas independientes al 80, 100 y 120%. Simultáneamente con las muestras, se analizaron dos estándares de concentración conocida al 100% de la concentración

nominal de trabajo para reportar los resultados de exactitud.

a.3 Veracidad

Para este estudio se trabajó con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método y aplicando la ecuación:

$$\% R = \frac{X_H \times 100}{X_A}$$

Donde: X_H = Cantidad de analito hallado
X_A = Cantidad del analito añadido
%R = Porcentaje de recuperación

a.4 Precisión

(1) Repetibilidad: se analizaron 6 muestras independientes de un mismo producto y se determinó la Desviación estándar (S) y Coeficiente de variación (RSD), teniendo como criterio de aceptación: Desviación estándar relativa (RSD) ≤ 4%.

(2) Precisión intermedia: se realizó el análisis del mismo lote empleado en el ensayo de repetibilidad usando el mismo método analítico, diferentes columnas y diferentes equipos. Se determinó la Desviación estándar (S) y el Coeficiente de variación (RSD), teniendo como criterio de aceptación: Coeficiente de variación entre analistas: ≤ 4%.

(3) Robustez: se confirmó la estabilidad de la muestra analizándola después de 24 horas a temperatura ambiente. Se consideraron seis muestras de la repetibilidad como análisis inicial y estas mismas se dejan en reposo por aproximadamente 24 horas a

temperatura ambiente y se vuelven a correr con un estándar recientemente preparado. La influencia de estos factores se evaluó calculando la desviación estándar relativa RSD ≤ 2% entre los resultados de las muestras trabajadas en las condiciones iniciales y las mismas muestras trabajadas con la nueva condición. La diferencia absoluta │di│ entre los resultados de ambas condiciones debe ser: ≤ 2%.

b. Determinación de los perfiles de disolución

Preparación de la solución estándar madre

Se pesaron 46,5 mg de fenilefrina clorhidrato y 18,5 mg de clorfeniramina maleato, se transfirieron a un matraz volumétrico de 250 mL; se añadieron 100 mL fase móvil y se sónico por 5 minutos, para luego llevar a volumen con fase móvil.

Preparación de la solución estándar

Se pesaron 55,0 mg de paracetamol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL; se añadieron 50 mL de fase móvil y se sónico por 5 minutos. Se transfirió 3 mL de la solución estándar madre y se enrasó con fase móvil; se homogeneizo y filtro por membrana de 0,45µmPVDF Millipore. Concentración aproximada de 0,0056 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, 0,0022 mg/mL de clorfeniramina maleato y 0,55 mg/mL de paracetamol.

Preparación de las muestras

Los perfiles de disolución se realizaron usando aparato 2 USP a 50 rpm en el equipo de disolución. Los medios de disolución fueron soluciones amortiguadoras USP para simular los fluidos fisiológicos del sistema gastrointestinal: pH 1,2 (fluido gástrico simulado sin enzimas), pH 4,5 (solución buffer acetato), y pH 6,8 (solución buffer fosfato) a 37 ± 0,5ºC. El volumen del medio de disolución a emplear fue de 900 mL. Se evaluaron doce tabletas de cada formulación por lote y en todos los procesos; las

muestras se tomaran de manera manual y los tiempos de muestreo establecidos fueron de 15, 30, 45, 60 y 75 minutos. Todas las muestras se filtraron a través de membranas de 0,45 µm PVDF Millipore. Concentración aproximada de 0,0056 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, 0,0056 mg/mL de clorfeniramina maleato y 0,55 mg/mL de paracetamol.

3.8 Reactivos

Estándares primarios de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato USP; acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker), fosfato monobásico de potasio (Merck), ácido fosfórico al 85% (J.T. Baker) y agua grado HPLC.

3.9 Equipos

HPLC Agilent Tecnologies 1260, equipado con bomba 1260-G1311B, auto muestreador 1260 ALS-G1329B, horno para columna l260 TCC-G1316A y detector de arreglo de diodos 1260 DAD-G4212B. Para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas, se empleó el programa Open lab.

Columna Zorbax SB Phenyl L-11 grupo fenilo ligado a partículas de sílice. 150 x 4.6 mm 5 µm (Agilent).

Equipo de disolución Sotax AT7 Smart

Balanza analítica Mettler Toledo XPE205

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Validación de la metodología

Especificidad

Los resultados en la evaluación de la especificidad (Tabla 1,2 y 3) de la técnica desarrollada permiten afirmar que es específico para cada principio activo, ya sea para muestras sin degradar como para muestras degradadas en los tres diferentes medios de disolución. Por lo tanto, puede emplearse para el ensayo de disolución de las tabletas que contengan estos principios activos; así como en los estudios de estabilidad. De acuerdo con los resultados se puede afirmar quela técnica desarrollada para este método es específico para la cuantificación de fenilefrina clorhidrato, paracetamol y clorfenamina maleato, en tabletas; porque las sustancias auxiliares no lograron interferir en la determinación o cuantificación de los principios activos. En el estudio de degradación artificial de muestras correspondiente a las materias primas no hubo disminución significativa en su concentración cuando fueron sometidas a termólisis, fotolisis, oxidación, hidrólisis básica y ácida, por lo tanto queda demostrado que la técnica desarrollada para este método es específico también para las muestras degradadas.

Tabla 1. Estudio de especificidad del método para muestras con medio de disolución pH 1,2

	Muestra sin degradar (%)	Termólisis (%)	Fotolisis (%)	Oxidación (%)	Hidrolisis ácida (%)	Hidrolisis básica (%)
Placebo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Principio activo (Fc)	99,8	98,5	99,9	100,1	98,6	98,4
Muestra (Fc + placebo)	100,2	99,3	100,7	98,5	99,4	98,2
Principio activo (Pa)	101,2	98,9	100,1	98,4	100,2	99,0
Muestra (Pa + placebo)	100,1	99,7	98,9	99,1	99,3	98,4
Principio activo (Cm)	101,0	99,1	98,3	99,5	98,7	98,8
Muestra (Cm +placebo)	101,1	98,7	99,1	98,8	98,5	99,3

Fc = fenilefrina clorhidrato, Pa = paracetamol, Cm =clorfenamina maleato

Tabla 2. Estudio de especificidad del método para muestras con medio de disolución pH 4,5 (buffer acetato)

	Muestra sin degradar (%)	Termólisis (%)	Fotolisis (%)	Oxidación (%)	Hidrolisis ácida (%)	Hidrolisis básica (%)
Placebo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Principio activo (Fc)	100,3	99,1	98,8	101,2	99,5	99,0
Muestra (Fc + placebo)	101,0	98,7	99,6	100,1	98,5	98,9
Principio activo (Pa)	100,0	99,5	99,4	99,2	101,3	98,8
Muestra (Pa + placebo)	100,6	98,7	100,4	99,0	98,9	100,1
Principio activo (Cm)	99,4	98,8	99,2	100,4	99,5	99,1
Muestra (Cm +placebo)	101,5	99,4	100,5	99,9	100,3	100,2

Fc = fenilefrina clorhidrato, Pa = paracetamol, Cm =clorfenamina maleato

Tabla 3. Estudio de especificidad del método para muestras con medio de disolución pH 6,8 (buffer fosfato)

	Muestra sin degradar (%)	Termólisis (%)	Fotolisis (%)	Oxidación (%)	Hidrolisis ácida (%)	Hidrolisis básica (%)
Placebo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Principio activo (Fc)	98,6	99,8	100,9	101,3	99,9	100,1
Muestra (Fc + placebo)	101,1	100,4	101,6	100,4	98,9	100,9
Principio activo (Pa)	100,0	99,7	98,7	99,1	101,0	98,6
Muestra (Pa + placebo)	99,9	101,4	100,9	98,7	101,7	100,3
Principio activo (Cm)	100,0	99,6	99,0	98,9	99,4	99,0
Muestra (Cm +placebo)	99,8	101,0	100,8	101,2	99,8	100,7

Fc = fenilefrina clorhidrato, Pa = paracetamol, Cm =clorfenamina maleato

Linealidad

Los resultados (Tabla 4,5 y 6) permiten afirmar que el método es lineal en el intervalo de concentración evaluado porque se obtuvieron coeficientes de correlación (r) ≥ 0,99 y coeficientes de determinación (r2) ≥ 0,98. Los coeficientes de variación de los factores de respuesta no fueron significativamente diferentes de (CVf) ≤ 2 %; el intervalo de confianza del intercepto y de la pendiente, estuvieron dentro de los rangos establecidos.

Tabla 4. Estudio de linealidad del sistema y método para muestras con medio de disolución pH 1,2

Linealidad Sistema	**Fenilefrina clorhidrato**	**Paracetamol**	**Clorfenamina maleato**
r Mayor 0.995	0,9994	0,9997	0,9996
r^2 Mayor 0.990 r	0,9993	0,9995	0,9995
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(4.667)}$	33196,157	14250,573	59875,273
IC-pendiente $T_{exp(2.16)} > T_{tabla}$	182,198	119,376	244,694
IC-intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.16)}$	1,939	0,500	2,004
CVf <2%	0,65 %	1,12%	0,69%
Linealidad Método			
r Mayor 0.995	1,0000	1,0000	0,9995
r^2 Mayor 0.990	1,0000	1,0000	0,9991
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(5.591)}$	338453,861	330625,4	7605,869
IC-pendiente $T_{exp} > T_{tabla(2.365)}$	581,768	575,000	87,212
IC-intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.365)}$	0,843	0,769	0,453
CVf <2%	0,104%	0,081%	0,567%

Tabla 5. Estudio de linealidad del sistema y método para muestras para muestras con medio de disolución pH 4,5 (buffer acetato)

Linealidad Sistema	**Fenilefrina clorhidrato**	**Paracetamol**	**Clorfenamina maleato**
r Mayor 0.995	0,9993	0,9995	0,9995
r^2 Mayor 0.990	0,9997	0,9993	0,9994
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(4.667)}$	31190,125	15150,463	58824,479
IC-pendiente $T_{exp(2.16)} > T_{tabla}$	185,258	118,215	223,129
IC-intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.16)}$	1,8946	0,7402	2,0150
CVf <2%	0,874 %	0,990%	0,798%

Linealidad Método			
r Mayor 0.995	0,9998	0,9997	0,9999
r^2 Mayor 0.990	1,0000	09998	0,9998
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(5.591)}$	307411,569	300589,176	7405,749
IC-pendiente $T_{exp} > T_{tabla(2.365)}$	580,567	595,076	97,208
IC-intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.365)}$	0,9571	0,7813	0,871
CVf <2%	0,245%	0,181%	0,763%

Tabla 6. Estudio de linealidad del sistema y método para muestras con medio de disolución pH 6,8 (buffer fosfato)

Linealidad Sistema	**Fenilefrina clorhidrato**	**Paracetamol**	**Clorfenamina maleato**
r Mayor 0.995	0,9997	0,9999	0,9998
r^2 Mayor 0.990	0,9994	0,9996	0,9998
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(4.667)}$	38221,746	13357,248	60874,369
IC-pendiente $T_{exp(2.16)} > T_{tabla}$	169,258	117,186	241,671
IC-intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.16)}$	1,874	0,764	2,074
CVf <2%	0,74 %	1,22%	0,79%
Linealidad Método			
r Mayor 0.995	0,9996	1,0000	0,9997
r^2 Mayor 0.990	1,0000	1,0000	0,9996
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(5.591)}$	297596,845	310627,245	7605,869
IC-pendiente $T_{exp} > T_{tabla(2.365)}$	478,496	565,258	78,875
IC-intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.365)}$	0,746	0,987	0,426
CVf <2%	0,560%	0,154%	0,506%

Exactitud

Los resultados (Tabla 7) permiten afirmar que el método es exacto, porque se obtuvieron porcentajes de recobrados dentro del rango establecido para cada principio activo (% R = 98 a 102 %) para cada nivel de concentración y el coeficiente de variación total recobrado menores al 2% (CVR total ≤ 2).

Tabla 7. Estudio de exactitud para muestras con los tres diferentes medio de disolución

	Medio de disolución					
	pH 1,2		**pH 4,5**		**pH 6,8**	
	% recobro	**CVR total**	**% recobro**	**CVR Total**	**% recobro**	**CVR total**
Fenilefrina clorhidrato	99,20	1,13%	98,70	0,78%	100,00	1,46%
Paracetamol	101,24	0,89%	99,58	1,12%	98,98	0,97%
Clorfenamina maleato	100,45	1,14%	99,11	1,05%	100,14	1,05%

Precisión

a. Repetibilidad. El método analítico cumple con el criterio de aceptación correspondiente, porque para el nivel de concentración al 100% de cada principio activo se evaluaron 6 muestras obteniéndose la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) ≤ 4,0 %. (Tabla 8)

Tabla 8. Estudio de repetibilidad para muestras con los tres diferentes medio de disolución

	Medio de disolución					
	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	S (%)	CV (%)	S (%)	CV (%)	S (%)	CV (%)
Fenilefrina clorhidrato	0,87	0,95	1,65	0,97	0,60	0,97
Paracetamol	0,45	1,24	0,99	0,45	0,95	1,00
Clorfenamina maleato	1,01	0,63	0,17	1,47	0,46	0,47

S=Desviación estándar, CV= Coeficiente de variación

b. Precisión intermedia. Los resultados indican (Tabla 9) que el método es preciso, independientemente del día en que se realice el análisis y de la experiencia del analista que lo ejecute, porque se obtuvo un coeficiente de variación total para cada principio activo (CV total) ≤ 4%.

Tabla 9. Estudio precisión intermedia para muestras con los tres diferentes medio de disolución

	CV total		
	Medio de disolución		
	pH 1,2 (%)	pH 4,5 (%)	pH 6,8 (%)
Fenilefrina clorhidrato	1,26	1,63	1,14
Paracetamol	0,87	1,16	1,04
Clorfenamina maleato	0,93	0,18	0,48

c. Robustez. Los resultados (Tabla 10) permiten afirmar que el método es robusto porque no se encontraron diferencias en las 6 muestras evaluadas al 100% al inicio y después de 24 horas a temperatura ambiente. La influencia de estos factores se evaluó obteniendo una desviación estándar relativa (DSR) ≤ 2%

Tabla 10. Estudio de robustez para muestras con los tres diferentes medio de disolución

DSR			
	Medio de disolución		
	pH 1,2	**pH 4,5**	**pH 6,8**
Fenilefrina clorhidrato	0,63%	1,14%	1,04%
Paracetamol	0,78%	0,16%	1,06%
Clorfenamina maleato	0,36%	1,47%	1,01%

4.2 Comparación de los perfiles de disolución

a. Perfiles de disolución medio pH 1,2

Los resultados (Tabla 11) según factor de diferencia (f1) y factor de similitud (f2) de fenilefrina clorhidrato indican que solo los perfiles de disolución de los productos A y D son similares al producto de referencia.

Tabla 11. Porcentaje promedio liberado de fenilefrina clorhidrato; resultado f1y f2

PRODUCTO	**Tiempo (minutos)**				
	15 (%)	**15 (%)**	**45 (%)**	**60 (%)**	**75 (%)**
Referencia	84,85	93,67	94,54	95,45	96,51
Producto A	75,51	82,39	87,51	88,86	90,60
f1 = 8,63			**f2 = 53,96**		
Producto B	46,74	51,91	53,44	54,87	56,99
f1 = 43,24			**f2 = 19,77**		
Producto C	42,72	49,96	51,44	52,66	53,64
f1 = 46,15			**f2 = 18,36**		
Producto D	76,21	80,50	82,36	89,64	92,22
f1 = 9,48			**f2 = 51,06**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

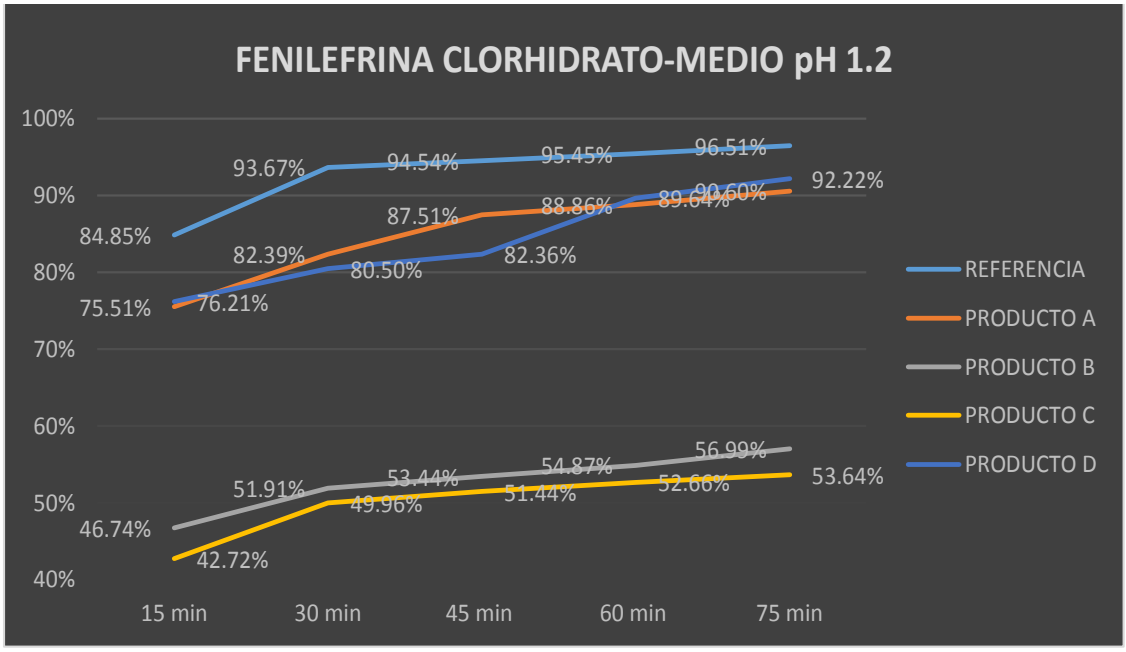


Figura 3. Comparación de los perfiles de disolución de fenilefrina clorhidrato en medio a pH 1,2.

Tabla 12. Porcentaje promedio liberado de clorfenamina maleato en medio de disolución pH 1,2; resultadof1 y f2

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	86,40	95,47	96,61	97,62	99,29
Producto A	76,91	84,05	88,64	91,13	92,54
f1 = 8,86			**f2 = 53,08**		
Producto B	48,63	52,29	55,63	57,80	60,27
f1 = 42,23			**f2 = 19,78**		
Producto C	44,63	51,95	53,80	55,07	56,07
f1 = 44,99			**f2 = 18,43**		
Producto D	77,46	81,83	84,06	90,90	95,24
f1 = 9,66			**f2 = 50,22**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

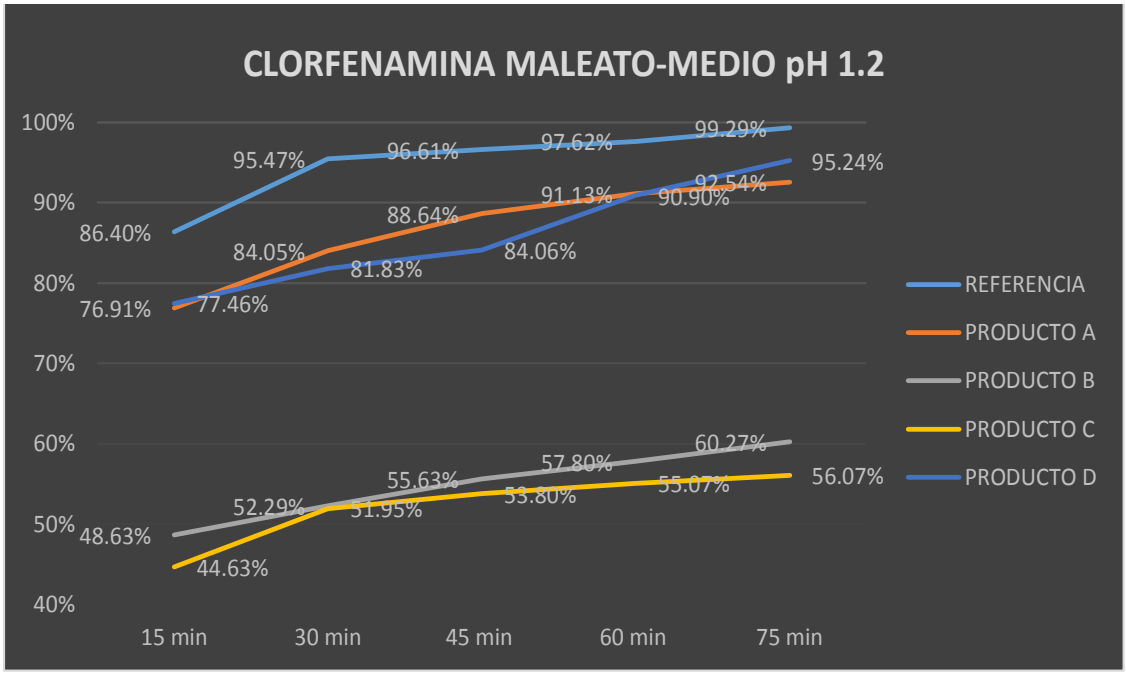


Figura 4. Comparación de los perfiles de disolución de clorfenamina maleato en medio pH 1,2.

Tabla 13. Porcentaje promedio liberado de paracetamol en medio de disolución pH 1,2; resultado f1 y f2

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	86,01	95,89	98,44	99,58	101,11
Producto A	74,59	85,68	89,03	92,16	95,27
f1 = 9,21			**f2 = 51,96**		
Producto B	46,03	51,23	53,92	55,89	58,59
f1 = 44,77			**f2 = 18,27**		
Producto C	42,68	49,21	51,44	53,20	54,61
f1 = 47,79			**f2 = 16,86**		
Producto D	75,26	83,71	86,97	92,11	95,24
f1 = 9,93			**f2 = 50,20**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

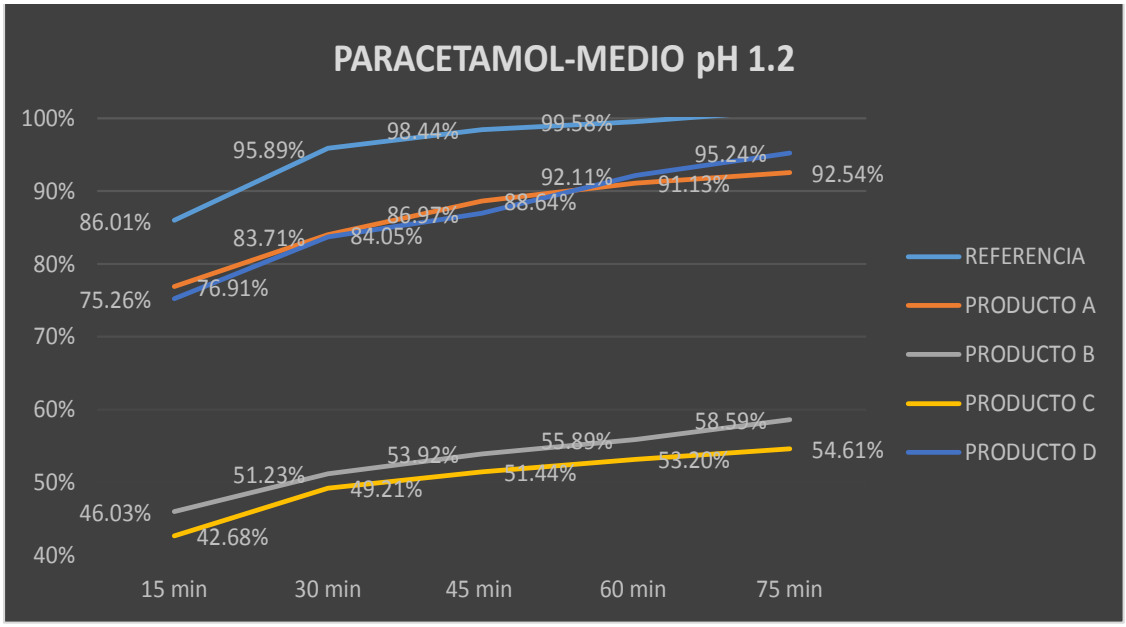


Figura 5. Comparación de los perfiles de disolución de paracetamol en medio pH 1,2

b. Perfiles de disolución medio pH 4,5

Tabla 14. Porcentaje promedio liberado de fenilefrina clorhidrato en medio pH 4,5; resultado f1 y f2

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	82,82	92,99	93,52	93,98	94,52
Producto A	76,37	87,23	88,43	89,42	91,82
f1 = 5,36			**f2 = 64,32**		
Producto B	47,30	49,00	50,08	51,51	52,96
f1 = 45,21			**f2 = 19,09**		
Producto C	42,44	48,58	49,81	51,32	52,29
f1 = 46,61			**f2 = 18,47**		
Producto D	78,05	87,47	88,50	90,08	91,27
f1 = 4,91			**f2 = 66,51**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

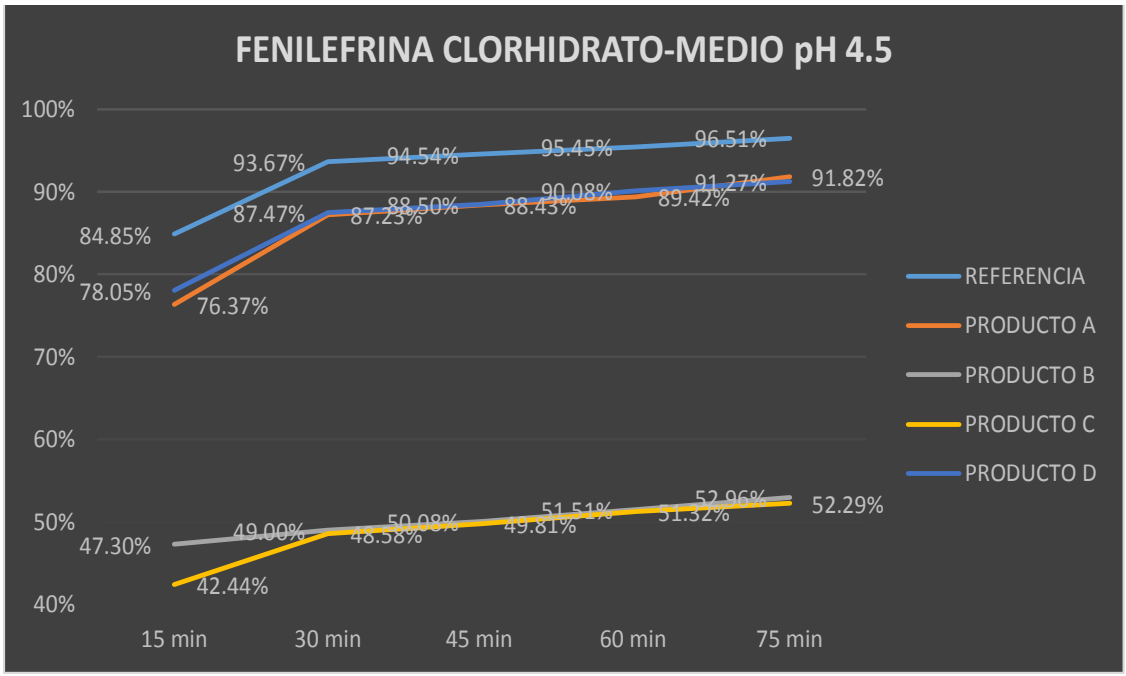


Figura 6. Comparación de los perfiles de disolución de fenilefrina clorhidrato en medio pH 4,5.

Tabla 15. Porcentaje promedio liberado de clorfenamina maleato en medio pH 4,5; resultado f1 y f2

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	80,71	91,40	92,42	93,22	93,86
Producto A	74,30	85,35	86,94	87,20	90,35
f1 = 6,08			**f2 = 62,29**		
Producto B	45,07	47,40	48,80	50,11	51,19
f1 = 46,29			**f2 = 18,87**		
Producto C	40,19	46,57	48,38	49,76	50,88
f1 = 47,79			**f2 = 18,22**		
Producto D	76,92	86,50	87,53	88,94	90,77
f1 = 4,64			**f2 = 68,01**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

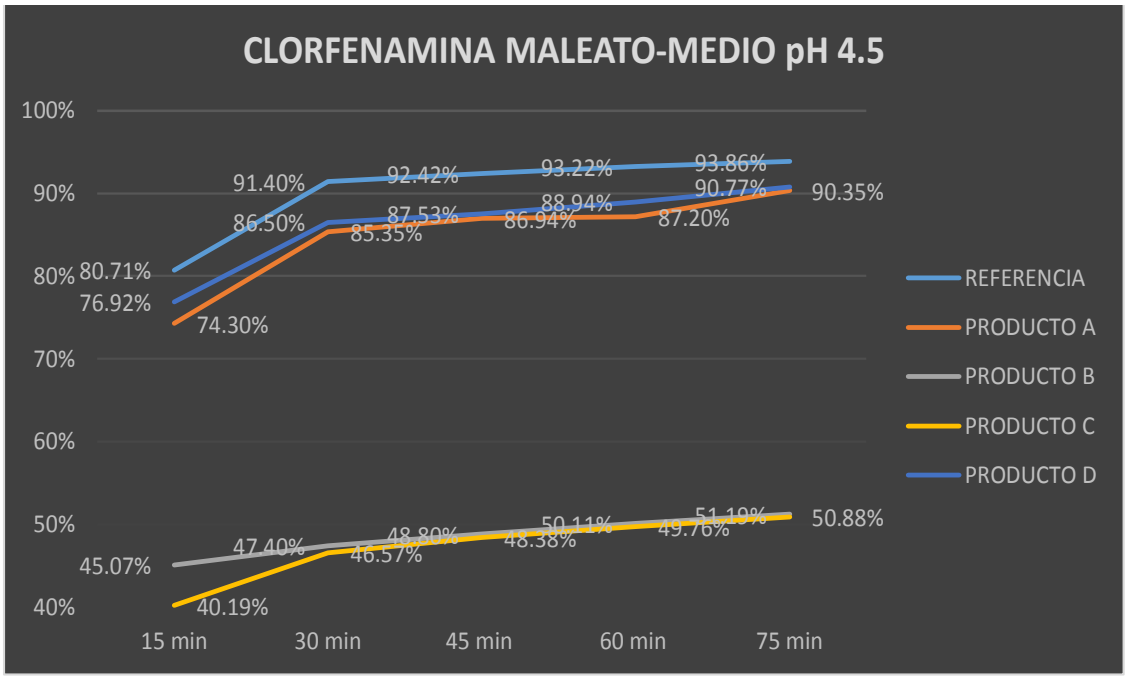


Figura 7. Comparación de los perfiles de disolución de clorfenamina maleato en medio pH 4,5.

Tabla 16. Porcentaje promedio liberado de paracetamol en medio pH 4,5; resultado f1 y f2

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	84,68	92,93	95,38	97,76	100,26
Producto A	78,66	88,11	92,80	95,08	97,07
f1 = 4,09			**f2 = 68,81**		
Producto B	56,76	61,02	64,85	67,07	69,90
f1 = 32,15			**f2 = 25,91**		
Producto C	53,47	56,97	58,93	61,45	64,28
f1 = 37,35			**f2 = 22,64**		
Producto D	80,23	89,40	91,06	92,81	95,07
f1 = 4,76			**f2 = 66,70**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

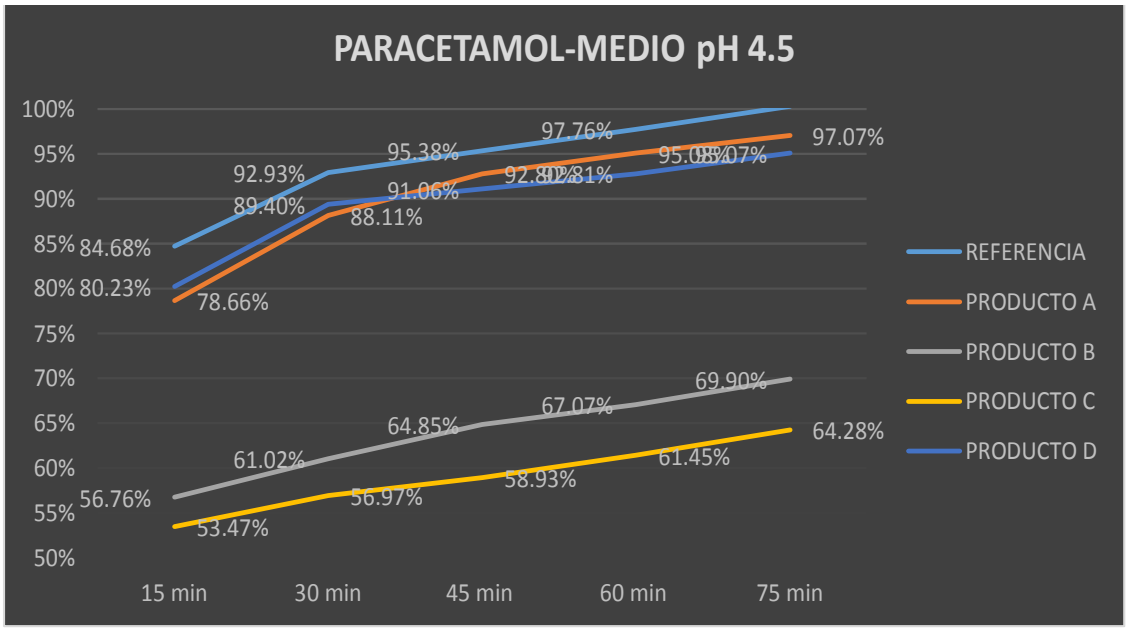


Figura 8. Comparación de los perfiles de disolución de paracetamol en medio pH 4,5.

c. Perfiles de disolución medio a pH 6,8

Tabla 17. Porcentaje promedio liberado fenilefrina clorhidrato en medio pH 6,8; resultado f1 y f2

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	82,82	92,99	93,52	93,98	94,52
Producto A	82,46	87,31	88,44	89,99	91,99
f1 = 3,85			**f2 = 69,18**		
Producto B	75,46	76,25	77,16	78,26	79,21
f1 = 15,61			**f2 = 41,56**		
Producto C	73,11	74,75	75,98	77,40	78,37
f1 = 17,08			**f2 = 39,83**		
Producto D	83,05	84,63	85,67	87,08	92,69
f1 = 5,50			**f2 = 60,65**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

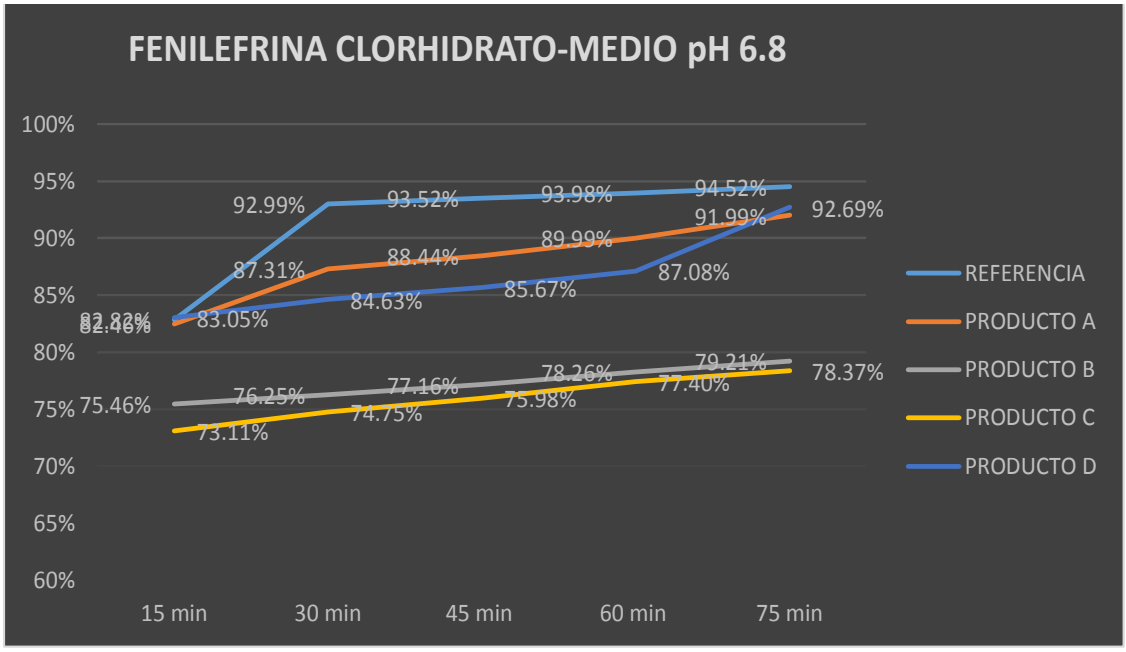


Figura 9. Comparación de los perfiles de disolución de fenilefrina clorhidrato en medio pH 6,8.

Tabla 18. Porcentaje promedio liberado clorfenamina maleato en medio pH 6,8; resultado f1 y f2

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	82,82	92,99	93,52	93,98	94,52
Producto A	82,46	87,31	88,44	89,99	91,99
f1 = 3,85			**f2 = 69,18**		
Producto B	75,46	76,25	77,16	78,26	79,21
f1 = 15,61			**f2 = 41,56**		
Producto C	73,11	74,75	75,98	77,40	78,37
f1 = 17,08			**f2 = 39,83**		
Producto D	83,05	84,63	85,67	87,08	92,69
f1 = 5,50			**f2 = 60,65**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

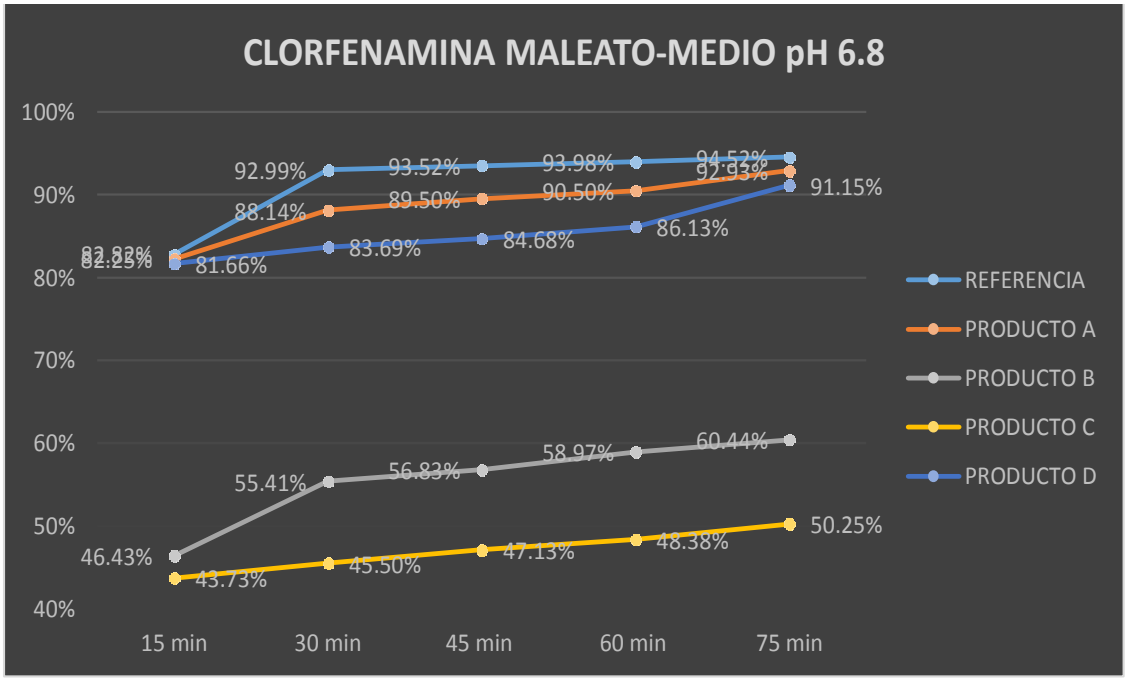


Figura 10. Comparación de los perfiles de disolución de clorfenamina maleato en medio pH 6,8.

Tabla 19. Porcentaje promedio liberado de paracetamol en medio pH 6,8; resultado f1 y f2.

PRODUCTO	Tiempo (minutos)				
	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	75 (%)
Referencia	84,23	95,52	96,99	98,21	100,35
Producto A	81,31	88,91	90,48	93,10	95,32
f1 = 5,50			**f2 = 63,01**		
Producto B	73,77	79,90	82,19	83,42	83,92
f1 = 15,17			**f2 = 41,78**		
Producto C	77,69	78,84	79,86	80,79	81,66
f1 = 16,09			**f2 = 39,86**		
Producto D	82,95	84,76	85,97	87,32	94,29
f1 = 8,42			**f2 = 52,45**		

Factor de diferencia (f1) = Rango de aceptación (0-15)

Factor de similitud (f2) = Rango de aceptación (50-100)

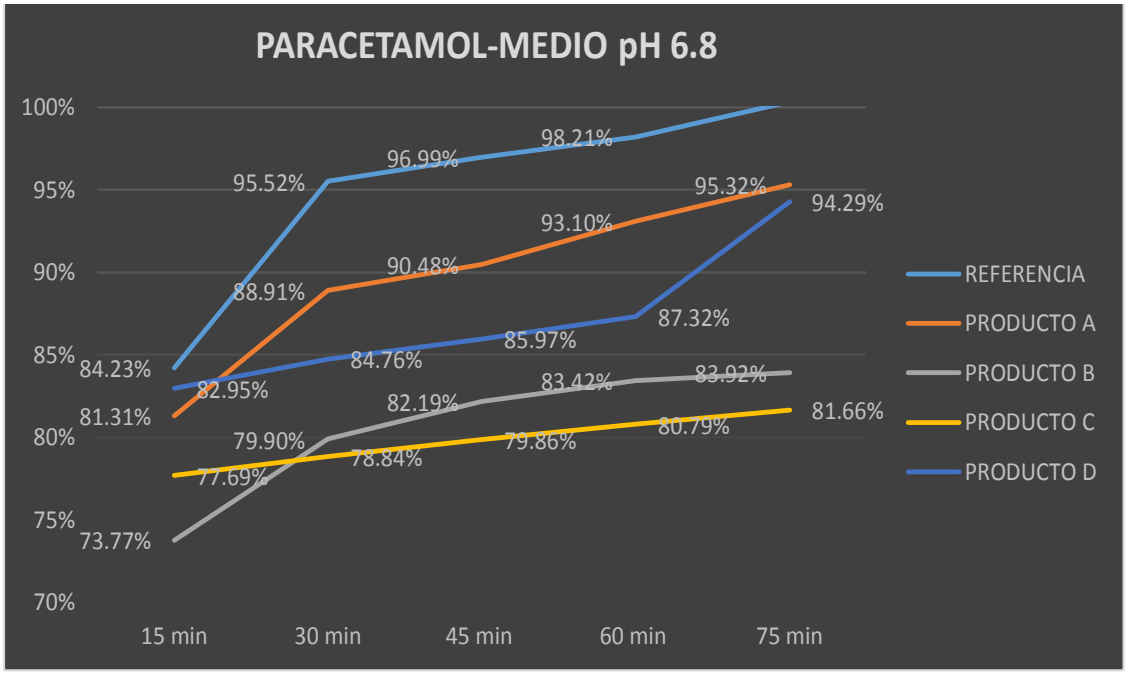


Figura 11. Comparación de los perfiles de disolución de paracetamol en medio pH 6,8.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para lograr determinar la equivalencia *in vitro* de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas; siendo necesario mencionar que este tipo de análisis presenta mayores ventajas por ser el principal método de separación de especies químicas estrechamente relacionadas. La determinación por HPLC, para la cuantificación de la equivalencia *in vitro* utilizando un Método Cromatografico UV con arreglo de diodos (DAD), como sistema de detección, es más exacto y específico para así poder determinar la existencia de algún elemento traza o excipiente. (USP 38 NF33 2015)

Para establecer las mejores condiciones cromatográficas se efectuaron diferentes ensayos en relación al tipo de fase estacionaria, proporción de los componentes y pH de la fase móvil. Considerando estas condiciones de trabajo se procedió a la validación de la metodología analítica propuesta, cuyos parámetros validados estuvieron dentro de los márgenes establecidos por ICH y la USP38; lo que hace que los datos obtenidos sean confiables y reproducibles. (USP 38 NF33, 2015). (ICH, 2005).

Sobre el método desarrollado y adaptado, para realizar la cuantificación de la combinación de paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas, es importante señalar que este ha sido validado demostrando ser sensible, selectivo y lineal para un amplio rango de concentraciones de estos tres activos, pudiendo ser de fácil implementación en la industria farmacéutica y constituir una herramienta valiosa para realizar el control de calidad de los medicamentos que se van a comercializar en nuestro país.

Para la comparación de los perfiles de disolución se utilizó el Modelo de Enfoque Independiente, utilizando un factor de similitud propuesto por el

Centro de Evaluación e Investigación de Drogas-1997-FDA, (CDER); que utiliza un factor de diferencia (f1) y un factor de similitud (f2) para comparar los perfiles de disolución, un enfoque independiente de modelo sencillo que utiliza un factor de diferencia (f1) y un factor de similitud (f2) para comparar los perfiles de disolución (Moore 1996).

En el desarrollo de los perfiles de disolución según las tablas 11, 12 y 13, las formulaciones B y C, evidenciaron una baja disolución a pH 1,2; en comparación con las formulaciones A y D, también evaluadas, las cuales resultaron ser similares al compararlas con el producto de referencia, según los datos obtenidos como el factor de similitud (f2) y factor de diferencia (f1). (US Food And Drug Administration, 2000)

En las Tablas 14,15 y 16, se demuestra que las formulaciones A y D, logaron una mejor disolución a pH 4,5; obteniendo factores de similitud (f2) y de diferencia (f1) aceptables, en comparación a las formulaciones B y C que no alcanzaron el mínimo requerido para ambos factores; concluyendo, según este modelo, que no son similares al producto de referencia. (US Food And Drug Administration, 2000)

Las determinaciones de los perfiles de disolución de las formulaciones en estudio B y C en medio de disolución a pH 6,8 no lograron establecer similitud con respecto al producto de referencia, según la evaluación de los factores de similitud (f2) y de diferencia (f1); con respecto a las formulaciones A y D se obtuvieron valores aceptables, lográndose determinar similitud según el análisis de los factores antes mencionado. (US Food And Drug Administration, 2000)

Se observaron diferencias con respecto a la liberación de los principios activos entre el producto de referencia, que liberó más del 80% a los 15 minutos en los tres diferentes medios pH 1,2, 4,5 y 6,8, y las formulaciones en estudio que no tuvieron el mismo comportamiento, logrando liberar en promedio más del 80% a los 30 minutos. Esta variación puede deberse a los

diferentes excipientes empleados en las formulaciones de las diversas tabletas y el producto de referencia. (EMA 2010).

El producto de referencia alcanza picos de liberación altos para clorfenamina maleato, fenilefrina clorhidrato y paracetamol en los primeros 15 minutos, en los tres medios de disolución a pH 1,2, 4,5 y 6.8, donde presenta porcentajes de liberación mayores al 85%, lo cual evidencia una alta velocidad de disolución. Este resultado es similar al reportado por Aliaga, R., Pozo, T., 2010 en el estudio de equivalencia *in vitro* de ciclosporina en cápsulas de gelatina blanda empleadas en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

A la actualidad no existen estudios *in vitro* relacionados que demuestren equivalencia farmacéutica de las formulaciones conteniendo clorfenamina maleato, fenilefrina clorhidrato y paracetamol que se expendan en nuestro medio. Pero, anteriormente, se realizó un estudio en tabletas de diazepam dispensadas en la ciudad de Ica realizada en el Instituto Nacional de Salud de Perú, en el cual lograron demostrar que solo dos de las tres formulaciones evaluadas son equivalentes farmacéuticos al compararlos con el producto de referencia. (Herrera, O., Grande, M., 2012)

CONCLUSIONES

1. Se logró desarrollar la técnica analítica por HPLC propuesta, obteniéndose una buena separación cromatografíca. El tiempo de retención para cada analito fue de 8,6 para fenilefrina clorhidrato, de 17,7 para paracetamol y de 31,2 para clorfeniramina maleato.

2. Se validó el método analítico por HPLC estableciéndose que es específico, lineal, veraz, preciso y robusto.

3. Se determinaron los perfiles de disolución en los tres medios de disolución a pH 1,2; 4,5 y 6,8 con cinco toma de muestra cada 15 minutos para evaluar la liberación de los principios activos del producto referencia y los cuatro productos en estudio.

4. Los perfiles de disolución de las cuatro formulaciones y el producto de referencia fueron evaluados de acuerdo a un método estadístico modelo independiente f1 y f2. Estos revelaron que de los productos en estudio, B y C, no son equivalentes farmacéuticos *in vitro*, ya que tienen un comportamiento diferente durante el desarrollo de los perfiles de disolución.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aliaga, R., Pozo, T. (2010). Estudio de equivalencia *in vitro* de ciclosporina en cápsulas de gelatina blanda empleadas en el HNERM. [Tesis Pre grado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Amidon, G. (1998). The role of the Biopharmaceutics Classification System and *in vitro-in vivo*. Correlation in the approval of drug products. Frankfurt am Main, Germany. 23 – 25 Marzo.

Castillo, E., Vásquez, M. (2003). El rigor metodológico en la investigación cualitativa. Revista Colombia Médica, 34 (3):164-7.

Congreso de la República del Perú (26 de noviembre 2009). Artículo 10. Ley 29459: Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos, y Productos Sanitarios. DO: El Peruano.

Correa, G., Valencia, P., Pérez,M., Echeverri, E. (2009). Estudio comparativo, cruzado, al azar, para la determinación de la bioequivalencia entre dos formulaciones de oxcarbazepina en tabletas.Universidad de Antioquia, 22 (3): 205.

Cuesta, F., Holguín, G., Ricardo, R, Joseph, A., Ruiz, A., Garay, M.,*et al.* (2011).Bioequivalencia de dos formulaciones de metformina, tabletas de 850 mg, en voluntarios sanos colombianos. Revista Médica Universidad de Antioquia, ISSN 0121-0793,18 (3): 289-301.

European Medicines Agency (EMA).Committee for medicinal products for human use. (2010). Guideline on the Investigation of Bioequivalence. London.

Fahmy, S., Abu, E**.** (2014)**.** *in vitro* Dissolution and *in vivo* Bioavailability of Six Brands of Ciprofloxacin Tablets Administered in Rabbits and Their Pharmacokinetic Modeling.BioMed Research International, a. ID 590848 ISSN 2314-6133. Dubái Emiratos Árabes Unidos.Jun, 2014:1-8.

Farmacopea de los Estados Unidos de América. (USP 38- NF 33), (2015).The United States Pharmacopeia Convention. Maryland. United Book Press.

Franklin, C. &Ballau, M. (2005). Reliability and validity in qualitativeresearch. En: Grinnell, R. &Unrau, Y. (Eds.). Social work: Research and evaluation. Quantitative and qualitativeapproaches. (pp.438-449). Nueva York: Oxford UniversityPress.

Guba, E., Lincoln, Y. (1989). Fourthgenerationevaluation. Newbury Park: Sage.

Herrera, O., Grande, M., (2012). Equivalencia terapéutica de tabletas de diazepam dispensadas en la ciudad de Ica, Perú. Rev. Med. Hered., 23(3):154-9.

Jiménez, B., (2000).Investigación cualitativa y psicología social crítica. Contra la lógica binaria y la ilusión de la pureza. Investigación cualitativa en Salud. Recuperado el 17 de octubre del 2007 de: http://www.cge.udg.mx/revistaudg/rug17/3invesigacion.html

Medina, A., (2009). Bioexenciones y estudios de bioequivalencia *in vitro.* Revista electrónica del Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica. 5: 9. Disponible en http://www.clinicaces.com/userfiles//Magazine-CECIF-No20-5-Feb-Mar-2009.pdf

Mertens, D. (2005). Research and evaluation in Education and Psychology: Integratingdiversitywithquantitative, qualitative, and mixedmethods. ThousandOaks: Sage.

Ministerio de Salud Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas.Directiva Sanitaria que regula los estudios de Equivalencia Terapéutica para demostrar la Intercambiabilidad de medicamentos. Disponible en http://www.digemid.minsa.gob.pe//PDF/Publicaciones/DocumentosConsulta/P08_2014-10 27_Directiva_Equivalencia.pdf.

Neelima K, Rajendra Y. (2014). Desarrollo y Validación de un Método Analítico para determinación simultanea de Hydralazina en Di nitrato de Isosorbida en granel y tabletas por HPLC. World J. Pharm. Pharm. Sci. 2014; 5(4): 1290-94.

Padrón, A., Jiménez, N., Calero, J., Gonzales, C., Correa, A., Olivera, L., Díaz, A. (2009)Bioequivalencia de una formulación cubana de Carbamazepina con el producto líder.Ciudad de la Habana, Ene/Abr.Rev. Cubana Firma 43 (1) ISSN 1561- 2988, 43(1). Recuperado en 04 de septiembre de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000100006&lng=es&tlng=es.

Ruiz, J., Ispizua, M. (1989). La descodificación de la vida cotidiana. Bilbao: Universidad de Deusto.

Samaniego, J., Arias, G.(2016). Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultanea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfenamina maleato en tabletas. Rev. Soc. Quim. Lima, 82 (2):196-207

The International Conference on Harmonistaion of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use (ICH). (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Ginebra.

US Food And Drug Administration. (2000).Guía para la IndustriaExención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéuticas. Disponible en http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm201453.htm

US Food And Drug Administration, (1997).Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata.Disponible enhttp://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm

Villalba, O., Ortiz, J., Grande, M., Isasi, J., Yantas, D., Fiestas, V. (2007). Estudio de Bioequivalencia de ibuprofeno 400 mg. tabletas, Rev. Perú. Med. Exp. Salud publica 24 (4) Lima Oct. /Dic.

World Health Organization (WHO), (2006). Annex 7: Multisource (generic) pharmaceutical products. Guidelines on registration requirements to stablish interchangeability. WHO technical report series No. 937. Geneva; Switzerland.

ANEXOS

Recibido el 14-03-2016
Aprobado el 30-06-2016

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE FENILEFRINA CLORHIDRATO, PARACETAMOL, SALICILAMIDA, CAFEÍNA Y CLORFENIRAMINA MALEATO EN TABLETAS

Jhonnel Samaniego Joaquín[a*], Gladys Arias Arroyo[a]

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas utilizando la cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (HPLC-RP). La fase móvil consistió en Buffer fosfato pH 3,5 y longitud de onda del detector ultravioleta de 202 nm para Fenilefrina clorhidrato, 298 nm para Paracetamol, 205 nm para Clorfeniramina maleato, 262 nm para Salicilamida y Cafeína. Se logró una buena separación cromatografica utilizando una columna L11 relleno de grupos fenilo de sílice. El tiempo de retención para cada analito fue de 8,6 para Fenilefrina clorhidrato, de 17,7 para Paracetamol, de 22,2 para Salicilamida, de 23,7 para cafeína y de 31,2 para Clorfeniramina maleato usando una elución en gradiente con acetonitrilo en proporción de un 20% como máximo a lo largo de la corrida cromatográfica. La precisión y veracidad fue mayor del 98% para los cinco activos y el tiempo de corrida fue de 40 minutos por muestra. La especificidad, linealidad, veracidad y precisión del método cromatográfico implementado permitirá su aplicación de forma rutinaria.

Palabras clave: Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína, Clorfeniramina maleato, Método analítico, cromatografía líquida de alta precisión.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY BY HPLC FOR THE SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF PHENYLEPHRINE HYDROCHLORIDE, PARACETAMOL AND CHLORPHENIRAMINE MALEATE TABLETS

ABSTRACT

It is developed and validated an analytical method for the simultaneous quantification of phenylephrine hydrochloride, Paracetamol, salicylamide, chlorpheniramine maleate and Caffeine tablets using Liquid Chromatography High Resolution reversed phase (HPLC-RP).

* Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú. jhonnel28@hotmail.com

The mobile phase consisted of phosphate buffer pH 3.5 and wavelength of 202 nm ultraviolet detector for phenylephrine hydrochloride, 298 nm for Paracetamol, Chlorpheniramine maleate to 205 nm, 262 nm for Salicylamide and Caffeine. a good chromatographic separation using a column filled L11 phenyl silica was achieved. The retention time for each analyte was 8.6 Phenylephrine hydrochloride for, for Paracetamol 17.7, 22.2 for salicylamide, caffeine and 23.7 to 31.2 Chlorpheniramine maleate for using gradient elution with acetonitrile in proportion of 20% maximum along the chromatographic run. The precision and accuracy was greater than 98% for the 5 assets and the running time was 40 minutes per sample. Specificity, linearity, accuracy and precision of the chromatographic method implemented can be implemented routinely.

Key words: Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol, Salicylamide, Caffeine, Clorfeniramina maleate, analytical method, high precision liquid chromatography

INTRODUCCIÓN

Es necesario adquirir conocimiento científico y tecnológico que nos permita contribuir y satisfacer las demandas de la sociedad y proporcionar solución a problemas de salud, por medio de medicamentos que en las últimas décadas son reemplazados por fármacos específicos. Los mismos que son elaborados por grandes laboratorios e industrias farmacéuticas; quienes tienen que estar atentos y cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio, así como el control de calidad del producto fabricado es indispensable para garantizarle al consumidor un medicamento confiable y seguro.

El continuo y rápido crecimiento del mercado farmacéutico exige que los laboratorios farmacéuticos se preparen y busquen la calidad en sus productos y procesos, para poder así utilizarlo como una ventaja frente a su competencia. Lo que requiere la necesidad de obtener certificaciones que garanticen la calidad del producto, como por ejemplo la certificación ISO 9001, el mismo que requiere la validación de los métodos analíticos con el que se realiza el control de calidad de sus productos.

Diferencias entre distintas formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular. El diseño de este nuevo método sirve de guía a la industria farmacéutica para la cuantificación simultánea de cinco principios activos como materia prima y en un producto terminado; basándose en la cromatografía líquida de alta resolución como una técnica automatizada que permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de los picos en los cromatogramas. Los resultados obtenidos fueron evaluados con un programa informático que integra tantos criterios de estadística y aceptación que especifica cada requisito, que permite generar resultados verídicos para asegurar y validar un método analítico de medicamentos que puede ser aprobado y autorizado.[1]

Con la cromatografía líquida de alta resolución que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales se pretende obtener una técnica analítica con tiempos de análisis rápidos, separación de sustancias de mezclas complejas con alta resolución, ejecución de análisis con facilidad y exactitud, obteniendo errores relativos menores al 2%. Además, el beneficio de la tecnología, al brindar un sistema automatizado que inyecta la muestra, realiza la separación, imprime la identificación de cada pico y su concentración para luego repetir el ciclo con la muestra siguiente.[2]

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas utilizando la cromatografía de líquida de alta precisión en fase reversa.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Fosfato monobásico de potasio (Merck), acetonitrilo (grado HPLC, J.T. Baker), ácido fosfórico al 85% (calidad R.A. J.T. Baker), agua (HPLC).

Material de referencia

Clorfeniramina maleato (estándar primario USP), Paracetamol (estándar primario USP), Salicilamida (estándar primario USP), Cafeína (estándar primario USP) y Fenilefrina clorhidrato (estándar primario USP),

Equipo Cromatógrafo

Agilent Tecnologies 1260, equipado con bomba 1260-G1311B, auto muestreador 1260 ALS-G1329B, horno para columna 1260 TCC-G1316A y detector de arreglo de diodos 1260 DAD-G4212B. Para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas, se empleó el programa Open lab.

Sistema cromatográfico

Se empleó como fase móvil una solución fosfato monobásico de potasio, se ajustó a pH 3,5 con ácido fosfórico al 85%. Se empleó una columna L11 relleno de grupos fenilo de sílice de 150 x 4,6 mm 5 µm (Agilent). Se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min hasta el minuto 7,0 y luego se aumentó el flujo a 1,0 mL/min hasta el minuto 22,0 de forma constante hasta el minuto 35,0 y luego se dismimuye el flujo a 0,5 mL/min hasta el minuto 40,0. También cuenta con una elución en gradiente de acetonitrilo a los 22,0 minutos en un 20% hasta el minuto 35,0 y luego continuo con fase móvil. Se empleó detección UV a 205 nm para Clorfeniramina maleato, 202 nm para Fenilefrina clorhidrato, 298 nm para Paracetamol, 262 nm para Salicilamida y Cafeína; temperatura de la columna 30ºC; volumen de inyección: 20µL.

Alcance del método

La metodología desarrollada y validada se aplicó para la cuantificación simultánea de Clorfeniramina maleato, Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida y Cafeína, elaborada por mezcla de soluciones de cada uno de los componentes activos, preparadas con los respectivos estándares primarios, así como para la valoración de una mezcla de los componentes activos en una muestra conformada por Clorfeniramina maleato, Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida y Cafeína, materia prima para tabletas.

Preparación de la solución estándar madre

Se pesaron 40,0 mg de Fenilefrina clorhidrato, 16,0 mg de Clorfeniramina maleato y 120,0 mg de Cafeína, se transfirieron a un matraz volumétrico de 200 mL. Se añadieron 100 mL fase móvil y se sónico por 5 minutos para luego enrasar con fase móvil.

Preparación de la solución estándar

Se pesaron 30,0 mg de Salicilamida y 30,0 mg de Paracetamol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL. Se añadieron 40 mL de fase móvil y se sónico por 5 minutos. Se transfirió 10 mL de la solución estándar madre y se enrasó con fase móvil. Se homogeneizó y filtró a través de una membrana de 0,45µm. Concentración aproximada de 0,02 mg/mL de Fenilefrina clorhidrato, 0,008 mg/mL de Clorfeniramina maleato, 0,3 mg/mL de Salicilamida, 0,06 mg/mL de Cafeína y 0,3 mg/mL de Paracetamol.

Preparación de las muestras

Se determinó el peso promedio de 20 tabletas y se trituraron para lograr homogeneidad. Se pesó con exactitud cantidad de polvo de tabletas equivalente a 10 mg de Fenilefrina clorhidrato, 4 mg de Clorfeniramina maleato, 150,0 mg de Salicilamida, 30,0 mg de Cafeína y 150 mg de Paracetamol, de polvo de tableta y se transfirieron cuantitativamente a un volumétrico de 200 mL. Se añadieron 100 mL de fase móvil y se sónico por 15 minutos. Se transfirió 10 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y se enrasó con fase móvil. Se homogeneizó y filtró por membrana de 0,45µm. Concentración aproximada de 0,02 mg/mL de Fenilefrina clorhidrato, 0,008 mg/mL de Clorfeniramina maleato, 0,3 mg/mL de Salicilamida, 0,06 mg/mL de Cafeína y 0,3 mg/mL de Paracetamol.

Parámetros a validar

Especificidad

a. Determinación de la interferencia de excipientes: Se analizó el placebo, como si fuera la muestra: El resultado de análisis del placebo no debe dar una respuesta cuantificable. Esto indica que los excipientes no interfieren en el análisis del analito.
   Se preparó una muestra de placebo con el principio activo al 100% y se efectuó el análisis respectivo comparando la respuesta del análisis con la de un patrón puro del principio activo. Se determinó la selectividad del método midiendo el grado de interferencia obtenida por la diferencia de resultados del análisis del principio activo con y sin placebo. Los resultados obtenidos deben concordar con ± 2% del teórico.
b. Determinación de interferencia de productos de degradación: Se trató la muestra con los siguientes métodos de degradación artificial del analito:

- Hidrólisis alcalina; por calentamiento en baño María a 80 °C con NaOH 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con HCl 0.1N.
- Hidrólisis ácida; por calentamiento en baño María a 80 °C con HCl 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con NaOH 0.1N.
- Oxidación, por 2 horas en baño María con V gotas de Peróxido de Hidrógeno al 30%.
- Termólisis, por calentamiento de la droga en estufa a 80°C por 10 horas.
- Fotólisis, exposición en lámpara de luz UV por 5 días.[5]

Linealidad

a. Linealidad del sistema: Se prepararon tres curvas de calibración con cinco concentraciones correspondientes al: 50, 75, 100, 125 y 150 % de la concentración teórica.
b. Linealidad del método: Se prepararon tres soluciones de placebo enriquecidos con los principios activos cada una por triplicado, que cubran el intervalo de trabajo y por pesadas independientes al 80, 100 y 120%. Simultáneamente con las muestras, se analizaron dos estándares de concentración conocida, al 100% de la concentración nominal de trabajo, para reportar los resultados de exactitud.[4]

Veracidad

Para este estudio se trabaja con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método.[5]

$$\%R = \frac{X_H \times 100}{X_A}$$

Donde: X_H = Cantidad de analito hallado; X_A = Cantidad del analito añadido

Precisión

a. Repetibilidad: Se analizaron seis muestras independientes de un mismo lote fabricado y se determinó su Desviación Estándar (S) y su Coeficiente de Variación (RSD). Teniendo como criterio de aceptación: Desviación estándar relativa (RSD) $\leq$ 2%.
b. Precisión intermedia: Un segundo analista realizó, en otro día, el análisis del mismo lote empleado en el ensayo de repetibilidad usando el mismo método analítico, diferentes columnas y diferentes equipos. Se determinó la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD) Teniendo como criterio de aceptación: Coeficiente de variación entre analistas: $\leq$ 4%.[6]
c. Robustez: Se confirmó la estabilidad de la muestra, analizándola después de 24 horas a temperatura ambiente. Se consideraron tres muestras de la repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras se dejan permanecer por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y se vuelven a correr con un estándar recientemente preparado. La influencia de estos factores se evaluará de la siguiente manera: Se calcula la desviación estándar relativa RSD $\leq$ 2% entre los resultados de las muestras trabajadas en las condiciones iniciales y las mismas muestras trabajadas con la nueva condición. La diferencia absoluta $|di|$ entre los resultados de ambas condiciones debe ser: $\leq$ 2%.[7]

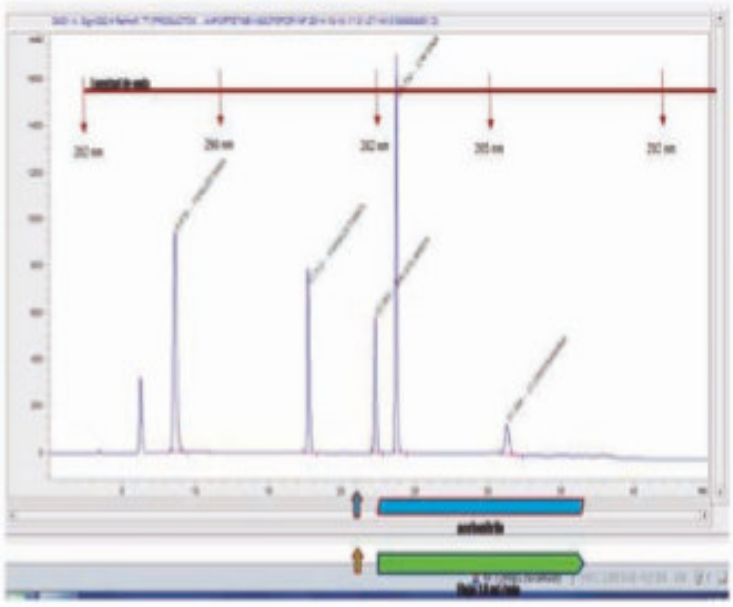


Figura 1. Cromatograma del estándar de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Especificidad

Los resultados en la evaluación de la especificidad (tabla 1) del método permiten afirmar que es específico para cada principio activo, ya sea para muestras sin degradar como para muestras degradadas. Por lo tanto, puede emplearse para la valoración de las tabletas que contengan estos principios activos. De acuerdo con los resultados se puede afirmar que: el método es específico para la cuantificación de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato en polvo de tableta porque las sustancias auxiliares no lograron interferir en la determinación o cuantificación de los principios activos, en el estudio de degradación artificial de muestras correspondiente a las materias primas no hubo una disminución significativa en su concentración cuando fueron sometidas a termólisis, fotólisis, oxidación, hidrólisis básica y ácida, por lo tanto queda demostrado que el método es específico también para las muestras degradadas.

Tabla 1. Resultados correspondientes al estudio de Especificidad del método

	Muestra sin degradar	Termólisis	Fotólisis	Oxidación	Hidrólisis ácida	Hidrólisis básica
Placebo	0,0 %	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Principio Activo (Fc)	99,8%	98,5%	99,9%	100,0%	98,6%	98,4%
Muestra (Fc + Placebo)	100,2%	99,3%	100,7%	98,5%	99,4%	98,2%
Principio Activo (Pa)	101,2%	98,9%	100,1%	98,4%	100,2%	99,0%
Muestra (Pa + Placebo)	100,1%	99,7%	98,9%	99,1%	99,3%	98,4%
Principio Activo (Sa)	100,6%	100,5%	101,1%	99,0%	99,1%	99,7%
Muestra (Sa + Placebo)	101,3%	98,9%	100,4%	98,7%	98,9%	98,2%
Principio Activo (Ca)	101,6%	99,4%	99,6%	99,1%	98,2%	99,4%
Muestra (Ca + Placebo)	100,9%	101,0%	98,9%	98,7%	99,1%	100,1%
Principio Activo (Cm)	101,0%	99,1%	98,3%	99,5%	98,7%	98,8%
Muestra (Cm +Placebo)	101,1%	98,7%	99,1%	98,8%	98,5%	99,3%

Fc = Fenilefrina clorhidrato, Pa = Paracetamol, Sa = Salicilamida, Ca = Cafeína, Cm =Clorfenamina maleato

Linealidad

Los resultados (tabla 2) permiten afirmar que el método es lineal en el intervalo de concentración evaluado porque se obtuvieron coeficientes de correlación (r) $\geq$ 0,99 y coeficientes de determinación (r2) $\geq$ 0,98. Los coeficientes de variación de los factores de respuesta no fueron significativamente diferentes de (CVf) $\leq$ 2 % y el intervalo de confianza del intercepto y de la pendiente estuvieron dentro de los rangos establecidos.

Tabla 2. Resultados correspondientes al estudio de linealidad del sistema y método

Linealidad sistema	**Fenilefrina clorhidrato**	**Paracetamol**	**Salicilamida**	**Cafeína**	**Clorfenamina maleato**
r Mayor 0,995	0,999	0,9995	0,999	0,999	0,999
r^2 Mayor 0,990	0,999	0,9991	0,999	0,999	0,999
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(5.027)}$	33196,157	14250,573	19515,508	85997,996	59875,273
IC-Pendiente $T_{exp(2.10)} > T_{tabla}$	182,198	119,376	139,698	293,254	244,694
IC-Intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.10)}$	1,939	0,50	0,656	0,508	2,004
CVf-<2%	0,65 %	1,12%	0,85%	0,63%	0,69%
Linealidad Método					
r Mayor 0,995	1,000	1,0000	0,9996	1,0000	0,9995
r^2 Mayor 0,990	1,000	1,0000	0,9991	0,9999	0,9991
Test ANOVA $F_{exp} > F_{tabla(3.291)}$	338453,861	330625,4	7794,823	161170,648	7605,869
IC-Pendiente $T_{exp} > T_{tabla(2.262)}$	581,768	575,000	88,288	401,461	87,212
IC-Intercepto $T_{exp} < T_{tabla(2.262)}$	0,843	0,769	2,303	0,128	0,453
CVf-<2%	0,10%	0,08%	0,85%	0,41%	0,56%

Veracidad

Los resultados (tabla 3) permiten afirmar que el método es veraz porque se obtuvieron porcentajes de recobrados dentro del rango establecido para cada principio activo (% R = 98 a 102 %) para cada nivel de concentración y el coeficiente de variación total recobrado menores al 2% (CVR total ≤ 2).

Tabla 3. Resultados correspondientes al estudio de veracidad

	R	CVR total
Fenilefrina clorhidrato	99,20%	1,13%
Paracetamol	99,15%	1,01%
Salicilamida	98,86%	0,86%
Cafeína	99,36	0,51%
Clorfenamina maleato	100,47%	1,10%

Precisión

a. Repetibilidad. El método analítico cumple con el criterio de aceptación correspondiente, porque para el nivel de concentración al 100% de cada principio activo se evaluaron seis muestras, obteniéndose la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) ≤ 2,0 %. (tabla 4)

Tabla 4. Resultados correspondientes al estudio de repetibilidad

	S	CV
Fenilefrina clorhidrato	1,63	0,91%
Paracetamol	1,16	1,19%
Salicilamida	0,12	0,79%
Cafeína	0,37	0,36%
Clorfenamina maleato	0,03	0,67%

b. Precisión intermedia. Los resultados indican (tabla 5) que el método es preciso, independientemente del día en que se realice el análisis y de la experiencia del analista que lo ejecute; porque se obtuvo un coeficiente de variación total para cada principio activo (CV total) ≤ 4 %.

Tabla 5. Resultados correspondientes al estudio precisión intermedia

	CV total
Fenilefrina clorhidrato	1,26%
Paracetamol	0,87%
Salicilamida	0,78%
Cafeína	0,86%
Clorfenamina maleato	0,93%

c. Robustez. Los resultados (tabla 6) permiten afirmar que el método es robusto porque no se encontraron diferencias en las tres muestras evaluadas al 100% al inicio y después de 24 horas a temperatura ambiente. La influencia de estos factores se evaluó obteniendo una desviación estándar relativa (DSR) ≤ 2%

Tabla 6. Resultados correspondientes al estudio de robustez.

	DSR
Fenilefrina clorhidrato	0,17%
Paracetamol	0,03%
Salicilamida	0,54%
Cafeína	0,41%
Clorfenamina maleato	0,22%

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar el método analítico propuesto, obteniéndose una buena separación cromatografica utilizando una columna L11 relleno de grupos fenilo de sìlice. El tiempo de retención para cada analito fue de 8,6 para Fenilefrina clorhidrato, de 17,7 para Paracetamol, de 22,2 para Salicilamida, de 23,7 para cafeína y de 31,2 para Clorfeniramina maleato usando una gradiente de flujo con acetonitrilo en proporción de un 20% como máximo a lo largo de la corrida cromatográfica que fue de 40 minutos por muestra.

El método desarrollado es específico ya que no se detectó interferencia con la matriz, ni con los productos de degradación.

El método es lineal en el intervalo de concentración del 50% hasta 150% de cada principio activo, siendo la muestra 100% igual a 0,02mg/mL de Fenilefrina clorhidrato, 0,008 mg/mL de Clorfeniramina maleato, 0,3 mg/mL de Salicilamida, 0,06 mg/mL de Cafeína y 0,3 mg/mL de Paracetamol. Obteniendo coeficientes de correlación (r) $\geq$ 0,99 y coeficientes de determinación (r2) $\geq$ 0,98. Además los coeficientes de variación de los factores de respuesta (CVf) fueron menores de 2 % y el intervalo de confianza del intercepto y de la pendiente estuvieron dentro de los rangos establecidos

El método es veraz ya que su capacidad analítica de dar resultados lo más cercano al valor real queda demostrado al no haber diferencia significativa entre la recuperación media de 99,20% para Fenilefrina clorhidrato, 99,15% para Paracetamol, 98,86% para Salicilamida, 99,36% para Cafeína y 100,47% para Clorfenamina maleato.

El método es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas realizadas al 100% de concentración nos permite obtener resultados repetitivos obteniendo una desviación estándar (S) y coeficientes de variación (CV) menores al 2% y además podemos decir que el método es reproducible porque en los resultados de la precisión intermedia se obtuvieron coeficientes de variación total (CV total) para cada principio activo menores al 4%.

El método es robusto, ya que no hay diferencia significativa con los resultados obtenidos trabajando las mismas muestras al inicio y después de 24 horas con desviación estándar relativa (DSR) de 0,17% para Fenilefrina clorhidrato, 0,03% para Paracetamol, 0,54% para Salicilamida, 0,41% para Cafeína y 0,22% para Clorfenamina maleato.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vallejo GF. Validación de la metodología analítica de cuantificación de clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en dos jarabes comerciales por cromatografía liquida de alta resolución [Tesis de grado Químico Farmacéutico]. Guatemala: Universidad de San Carlos; 2009.
2. Contreras RJ, Jardines LY, Fonseca M, Águila B. Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación del principio activo en tabletas de Controfilina-200. Revista CENIC. Ciencias Químicas. 2005; 36(2):74-81.
3. Trejos CN, Tello EM. Validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de sulfadiazina de plata en crema. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2008; 37(2): 191-199.
4. Neelima K, Rajendra Y. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para determinación simultanea de Hydralazina en Di nitrato de Isosorbida en granel y tabletas por HPLC. World J Pharm Pharm Sci. 2014; 5(4): 1290-1294.
5. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use. (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Ginebra: ICH; 2005.
6. The United States Pharmacopeia Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 38 NF 33. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; 2015.
7. Collado CA, Moreno LO, García PC, Gómez CM, Barrios M, Begué M. Validación del método analítico para el control de la calidad y estudio de estabilidad de ribavirina inyectable 100 mg/mL. Rev cub farm. 2010; 44(4): 485-493.