



**BENÉMERITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS**

Centro de Química

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO
PARA EL ANÁLISIS DE PARACETAMOL, CAFEÍNA Y
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN MEDICAMENTOS
COMERCIALES”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

PRESENTA

ANAHÍ DE JESÚS HERNÁNDEZ GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. L. ESMERALDA GARCÍA DÍAZ

PUEBLA 2015

Dedicatorias

A mis padres, Moisés y Cristina, por estar a mi lado en cada paso de mi vida y carrera universitaria. Gracias por sus consejos, amor y tiempo dedicado para hacerme una mejor persona. Ustedes son mi ejemplo a seguir.

A mis hermanas, Rosalía y Michelle, gracias por estar conmigo en los momentos difíciles.

A Juan Carlos y Maricruz, mis amigos de toda la carrera, un placer conocerlos.

A Víctor, gracias por tu cariño y apoyo en este proyecto

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes de la Comisión Revisora y miembros del Jurado

1 QFB María Reina Jurado Andrade	Fac. de Cs. Químicas de la BUAP
2 Dra. Verónica Vázquez Valdivia	Fac. de Cs. Químicas de la BUAP
3 Dra. Erika Méndez Albores	Fac. de Cs. Químicas de la BUAP

A los profesores que colaboraron en el desarrollo del presente trabajo

A la Doc. María de la Paz Elizalde por la oportunidad brindada para realizar este proyecto.

A la Doc. Lidia Esmeralda García mi asesora de Tesis, gracias por compartir su conocimiento y su tiempo en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Jessica, Mario, Hilda, Alba gracias por hacer tan grato el desarrollo de este trabajo.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Adsorción y Cromatografía del Centro de Química del ICUAP

INDICE

	Pág.
Objetivos	1
Hipótesis	1
Introducción	2
Capítulo I Antecedentes	
1.1 Cromatografía	3
1.2 Cromatografía líquida de alta resolución	3
1.3 Validación de un método cromatográfico	4
1.4 Pruebas de estabilidad	5
1.5 Farmacología de paracetamol, cafeína y AAS	6
Capítulo II Parte experimental	
2.1 Extracción de los principios activos	9
2.2 Análisis cromatográfico	10
2.3 Validación del método cromatográfico	
2.3.1 Selectividad	10
2.3.1.1 Aptitud del sistema	10
2.3.2 Linealidad	12
2.3.3 Precisión	12
2.3.4 Exactitud	13
2.3.5 Sensibilidad	14
2.3.6 Robustez	14
2.4 Degradación de los principios activos de Bioelectro®	
2.4.1 Fotólisis	15
2.4.2 Humedad y temperatura	15
Capítulo III Resultados y discusión	
3.1 Extracción de los principios activos	17
3.2 Validación del método cromatográfico	
3.2.1 Selectividad	18
3.2.1.1 Aptitud del sistema	19
3.2.2 Linealidad	20
3.2.3 Precisión	21
3.2.4 Exactitud	22

3.2.5 Sensibilidad	22
3.2.6 Robustez	22
3.3 Cuantificación de ácido salicílico	24
3.4 Degradación de los principios activos de Bioelectro®	
3.4.1 Fotólisis	28
3.4.2 Humedad y temperatura	32
Capítulo IV Conclusiones	34
Capítulo V Bibliografía	35

Lista de abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AEFI	Asociación Española de Farmacéuticos de la industria
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
COX	Ciclooxigenasas
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FDA	United States Food and Drug Administration
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de diodos
HPLC-QTOF-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas
ICH	International Conference on Harmonisation
M ₁	Agitación en barra
M ₂	Agitación en digestor ultrasónico
M ₃	Agitación en cubeta ultrasónica
PGs	Prostaglandinas
USP	United States Pharmacopeia

Nomenclatura

Símbolo	Descripción
B	Ordenada del origen
k'	Factor de capacidad
M	Pendiente
m/z	Relación masa/carga
N	Número de platos teóricos
R	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
R%	Recuperación porcentual
R	Resolución
RSD	Desviación estándar relativa
S	Desviación estándar
T	Asimetría
t_m	Test de student de la pendiente
t_{ob}	Test de student para la exactitud
t_r	Test de correlación lineal
t_R	Tiempo de retención
$t_{v,\alpha}$	Valor de t de student tabulado
R	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
W	Ancho de un pico cromatográfico
A	Selectividad
μ	Media real
\bar{X}	Media experimental

Lista de figuras

Número	Título de la figura	Pág.
1.1	Esquema general de un cromatógrafo de líquidos	4
1.2	Funciones de la COX	7
2.1	Esquema general de trabajo	9
2.2	Pico cromatográfico asimétrico	12
2.3	(1) Reactor tesoratizado, (2) lámpara UV a 254 nm y (3) sistema de enfriamiento por reflujo.	15
2.4	a) Curva de presión de vapor de disoluciones de H ₂ SO ₄ . b) Desecador utilizado para la prueba de humedad: desecador (1), tabletas de Bioelectro (2), vaso de precipitado con solución de ácido sulfúrico al 10% (3).	16
3.1	Cromatogramas de extracción de a) Bioelectro®, b) Tempra® y c) Paracetamol genérico por tres diferentes métodos. El pico 1 corresponde a paracetamol, pico a 2 cafeína y pico 3 a AAS.	17
3.2	a) Cromatograma de los componentes de Bioelectro® y los estándares de paracetamol (P1), cafeína (P2) y AAS (P3). b) Espectros UV-visibles de los picos cromatográficos.	19
3.3	Curva de calibración de cafeína y paracetamol (eje izquierdo) y AAS (eje derecho) medidos a la longitud de onda de máxima absorbancia de cada compuesto.	20
3.4	Cromatogramas correspondientes a las variantes realizadas en el método cromatográfico	23
3.5	Reacción de fenol y Fe ₃ Cl	24
3.6	a) Curva de calibración de ácido salicílico en y b) cromatograma de una muestra de Bioelectro® y ácido salicílico utilizando un detector QTOF-MS polaridad negativa.	25
3.7	Cromatograma los componentes de Bioelectro ionizados positivamente.	26
3.8	Fotografía a) Bioelectro® en solución t ₀ y b) Bioelectro® t ₉ después de la fotólisis.	28
3.9	Cromatogramas de la fotólisis de Bioelectro a tiempo 0, 5 y 9 horas analizados a 300 nm. Paracetamol (pico 1), producto (pico 2), cafeína (pico 3), AAS (pico 4) y ácido salicílico (pico 5).	29
3.10	Espectros de los picos correspondientes al cromatograma de fotólisis. Línea continua corresponde a t ₀ , línea punteada a t ₉ .	29
3.11	Cromatograma de la fotólisis de Bioelectro® después de 9 horas analizado por HPLC-QTOF-MS	30
3.12	Cromatogramas de Bioelectro® en condiciones de temperatura y humedad analizado en un detector QO-TOF	33

Lista de tablas

Número	Título de tabla	Pág.
1.1	Parámetros para la validación de un método cromatográfico por diferentes organismo internacionales.	5
1.2	Estructura química de AAS, paracetamol y cafeína	8
2.1	Criterios de aceptación para linealidad.	11
3.1	Porcentaje de extracción de los principios activos de Bioelectro® Tempra® y Paracetamol genérico.	18
3.2	Tiempos de retención de los picos correspondientes a los principios activos de Bioelectro®, Tempra®, paracetamol genérico	19
3.3	Parámetros cromatográficos calculados para aptitud del sistema.	20
3.4	Parámetros de la linealidad para: paracetamol, cafeína y AAS.	21
3.5	Resultados de precisión para AAS, paracetamol y cafeína.	21
3.6	Resultados de exactitud para AAS, paracetamol y cafeína.	22
3.7	Resultados de límite de detección y límite de cuantificación para: paracetamol, cafeína y AAS.	22
3.8	Resultados de límite de detección y límite de cuantificación para: paracetamol, cafeína y AAS.	23
3.9	Relación m/z de los componentes de Bioelectro®, el signo que precede al número de pico corresponde a la polaridad en que fue observado.	27
3.10	Relación m/z de los componente de Bioelectro® en fotólisis	31

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método cromatográfico por HPLC para la determinación de paracetamol, cafeína y AAS en medicamentos analgésicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar un método cromatográfico con los criterios establecido en la USP en su trigésima edición para el análisis de los componentes de Bioelectro®. Tempra® y Paracetamol genérico.
- Cuantificar ácido salicílico como impureza de AAS.
- Identificar los productos de degradación de paracetamol, cafeína y AAS en pruebas de degradación.

HIPÓTESIS

El método cromatográfico validado permitirá la identificación y cuantificación de paracetamol, cafeína y AAS en tres medicamentos comerciales y el estudio de la degradación de los componentes activos.

INTRODUCCIÓN

La calidad en un producto farmacéutico deriva de la cuidadosa atención a todos aquellos factores que pueden influir en ella: selección de sus componentes, materiales, diseño de productos o procesos y de un control estadístico. Para obtener medicamentos seguros y eficaces de forma continua es necesario que la calidad sea constante. Este objetivo sólo se alcanza cuando las especificaciones que se aplican están basadas en procedimientos validados.

La validación se define como el establecimiento de pruebas de laboratorio debidamente documentadas, que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados, es decir, que dicho proceso será apropiado para el uso propuesto. La validación forma parte de las Buenas Prácticas de toda empresa, los resultados que de ella deriven tienen mucho peso ante una inspección sanitaria. Al estar conscientes de sus beneficios, es un requisito normativo y se le considera dentro de las prácticas de aseguramiento de la calidad.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se ha convertido en una herramienta importante en los procedimientos de rutina de la industria farmacéutica. Su uso es aplicable a diferentes áreas, desde el laboratorio de desarrollo farmacéutico hasta el área de control de calidad.

Cuando una empresa farmacéutica desarrolla un método cromatográfico por HPLC, es necesaria la validación de dicho método para proporcionar evidencia documentada a las entidades regulatorias correspondientes entre ellos COFEPRIS de que el procedimiento utilizado brinda resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones de calidad establecidas.

En este trabajo se desarrolló y válido un método analítico por HPLC con los criterios establecidos en la USP en su trigésima edición para el análisis de paracetamol, cafeína y AAS en tres medicamentos comerciales. También se determinó la concentración de ácido salicílico como impureza por HPLC-QTOF-MS. Por último se estudió la degradación del medicamento Bioelectro® por medio de fotólisis, humedad y temperatura.

Capítulo I

Antecedentes

1.1 Cromatografía

Se entiende por cromatografía al conjunto de técnicas analíticas que se fundamentan en la separación que se da cuando una mezcla de compuestos son arrastrados por una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria [1]. La separación se produce debido a los procesos de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica que ocurren en la fase estacionaria [2]. A la distribución final de los componentes en función del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma.

Los tipos de cromatografía útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo que se emplean en los procedimientos cromatográficos de la USP son: cromatografía en papel, en capa delgada, columna de gases y de líquidos (HPLC) [3].

1.2 Cromatografía líquida de alta resolución

La HPLC es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por un proceso de partición, adsorción o intercambio iónico según el tipo de fase estacionaria empleada. Se clasifica en fase normal y fase reversa de acuerdo a la polaridad de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la fase estacionaria.

En la cromatografía de fase reversa la fase móvil es polar y la fase estacionaria es no polar. Aquí la partícula base de sílicagel se modifica químicamente para reemplazar los grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C18), octilsilano (C8), fenilo, ciano (CN), amino, diol, etc. [4].

Un cromatógrafo de líquidos (figura 1.1) consta de un reservorio que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos.

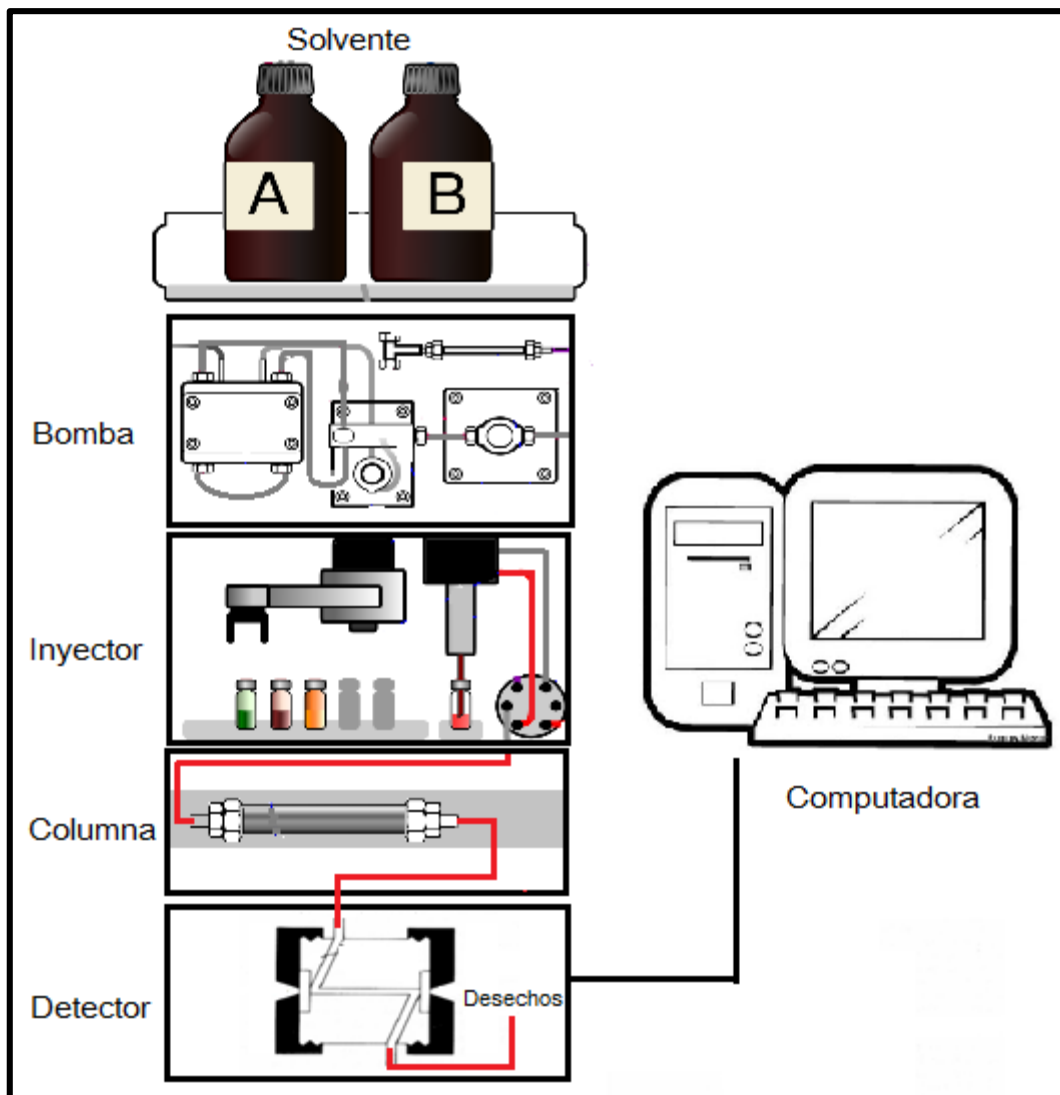


Figura 1.1 Esquema general de un cromatógrafo de líquidos

La HPLC es una técnica que tiene gran importancia en la industria farmacéutica ya que permite el análisis cuantitativo y cualitativo de materia prima y producto terminado. Es una herramienta necesaria para evaluar la seguridad y calidad que requiere un medicamento.

1.3 Validación

La validación es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos [5]. Es un requerimiento de organismos oficiales como son la United States Food and Drug Administration (FDA), International Conference on Harmonisation (ICH) y la United States

Pharmacopeia (USP). En México la instancia encargada de vigilar que los medicamentos cumplan con todos los lineamientos para su venta es la COFEPRIS con base en la FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos) las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) y la NOM-059.SSA1-2013 (Buenas prácticas de fabricación de medicamentos) [5...6].

Para alcanzar los niveles de calidad requeridos según las normas oficiales se requiere que cada una de las etapas de producción se realice de forma adecuada y cumpliendo con los parámetros de calidad establecidos previamente.

Antes de iniciar una validación se debe verificar que las instalaciones donde se realizará la misma sean adecuadas, al igual que los procedimientos operativos que se van a utilizar, que los equipos estén calificados, que los materiales y reactivos sean los adecuados, las sustancias de referencia con las cuales se hará la validación tengan trazabilidad y que el personal a cargo de la validación esté capacitado y entrenado. Una vez que el sistema o proceso se ha validado, este debe permanecer inalterado y bajo control.

Existen tres tipos de validación de acuerdo al proceso de fabricación:

Validación retrospectiva: Estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que estaba previsto sobre la base de una revisión y análisis de información histórica.

Validación prospectiva: Estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en un protocolo planificado.

Validación concurrente: Estudio para demostrar y establecer evidencia documentada de que un proceso hace lo que debe hacer basado en información generada durante una implementación real del proceso. También se le denomina revalidación. La validación concurrente es muy utilizada cuando se ha variado una etapa del proceso, ante cambios de proveedores de excipientes, cambios en las fórmulas de recubrimiento, sustitución o adición de excipientes. Puede considerarse como una evaluación continua del proceso [7].

1.3.1 Validación de un método analítico

La validación está basada en la identificación de las variables del proceso que más influyen en las características de calidad del producto. Así, el proceso de fabricación de comprimidos a partir de una materia prima está compuesto por una serie de

etapas críticas como son: pre-mezclas de excipientes y principio activo, amasado, mezclado con el lubricante y compresión. Un error en cualquiera de estas etapas puede afectar la uniformidad de contenido de los comprimidos y como consecuencia el incumplimiento de las especificaciones farmacopeicas.

Para la evaluación de estas etapas críticas en base a los parámetros de identidad, riqueza, calidad y pureza del medicamento se requiere la validación de un método analítico que otorgue la seguridad necesaria para aplicar el método y la veracidad de los resultados obtenidos.

Los métodos analíticos se clasifican en 4 categorías [8]:

CATEGORÍA I: Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (como por ejemplo, disolución, liberación de principios activos).

CATEGORÍA II: Métodos analíticos para la cuantificación los principios activos en productos farmacéuticos.

CATEGORÍA III: Determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.

CATEGORÍA IV: Pruebas de identificación.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica. En la tabla 1.1 se indican los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías

Tabla 1.1 Parámetros para la validación de un método analítico

Tipo de análisis	Categoría				
	I	II	III		IV
			Cuantificación	Identificación	
Exactitud	**	SI	SI	-	-
Precisión	SI	SI	SI	-	-
Selectividad	**	SI	-	SI	SI
Límite de detección	**	-	-	-	-
Límite de cuantificación	**	-	-	-	-
Linealidad	**	SI	-	-	-

**Depende del tipo de prueba a realizar disolución, liberación, etc.

La ICH recomienda hacer los estudios de robustez al inicio del desarrollo del método para proporcionar fiabilidad a los resultados ante pequeños cambios a los que puede ser susceptible el método durante su utilización.

Existen artículos publicados para el análisis de ácido acetilsalicílico (AAS), paracetamol y cafeína en combinación con otros fármacos mediante HPLC [9-11] además de la monografía oficial en la USP 30. Sin embargo la Asociación Española de Farmacéuticos de la industria (AEFI) no recomienda considerar ningún método oficial o de farmacopea totalmente validado para un medicamento, pues difícilmente tendrán los mismos componentes o proporción de excipientes, con la posibilidad de diferir también en el equipo utilizado [12].

1.4 Pruebas de estabilidad

El objetivo de los estudios de estabilidad, es proporcionar evidencia documentada de cómo la calidad de un fármaco o un medicamento varía con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales extremos como temperatura, humedad o luz. Estos estudios permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de reanálisis y periodo de caducidad de un medicamento [13].

Para diseñar o modificar un método de análisis para un estudio de estabilidad es indispensable conocer el comportamiento de la molécula del fármaco y del producto o productos de degradación. Esto requiere de métodos de análisis específicos, sensibles, exactos, precisos y robustos [14].

Los tipos de degradación más importante de los productos farmacéuticos son la hidrólisis, la oxidación y la fotólisis. Estas reacciones llevan a cambios en el fármaco o medicamento como aparición de color, precipitación, generación de malos olores y sabores. Y lo más importante, la generación de productos con efectos farmacológicos adversos [15].

El paracetamol es un fármaco poco soluble en agua. Sus soluciones en medio acuoso son inestables ante la presencia de oxígeno y/o de la luz y se descompone por diferentes vías de degradación. La inestabilidad en medio acuoso se manifiesta por la aparición de sustancias de degradación que originan coloración en la disolución. Entre las diferentes sustancias causantes de esta coloración encontramos las benzoquinoaminas que son hepatotóxicas en humanos [16]. Koshy y col [17] describen la hidrólisis de paracetamol en medio ácido- base y reportan a p-aminofenol y ácido acético como productos de degradación.

La hidrólisis es la reacción de degradación más común en el AAS formando ácido salicílico. A su vez la oxidación de ácido salicílico produce compuestos no aromáticos de tipo quinona que provocan efectos adversos en la salud.

La cafeína es una xantina de origen natural que tiene propiedades antimutagénicas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes además de un eficiente eliminador de radicales de oxígeno. De acuerdo a artículos reportados [18-19] el principal producto de oxidación de la cafeína es el ácido 1, 3, 7-trimetilúrico resultando de la hidroxilación en el C8.

1.5 Farmacología de AAS, paracetamol y cafeína

BIO-ELECTRO® (AAS, paracetamol, cafeína) TEMPRA® ES3 (paracetamol y cafeína) y Paracetamol genérico son medicamentos comúnmente utilizados en el tratamiento de cefalea tensional (dolor de cabeza), migraña o jaqueca, malestares asociados con fiebre y dolor, síntomas del resfriado común, dolor de muelas y oídos, dolores musculares, dolores articulares y cólico menstrual [20-21].

Las moléculas implicadas en los procesos inflamatorios o de fiebre presentes en un estado patológico son las prostaglandinas (PGs). Estas moléculas son sintetizadas a partir de ácido araquidónico (AA) por enzimas microsomales denominadas ciclooxigenasas (COX). Se presentan en tres isoformas, la COX-1, la COX-2 y la COX-3, cuyas funciones se encuentran en la figura 1.2 [22].

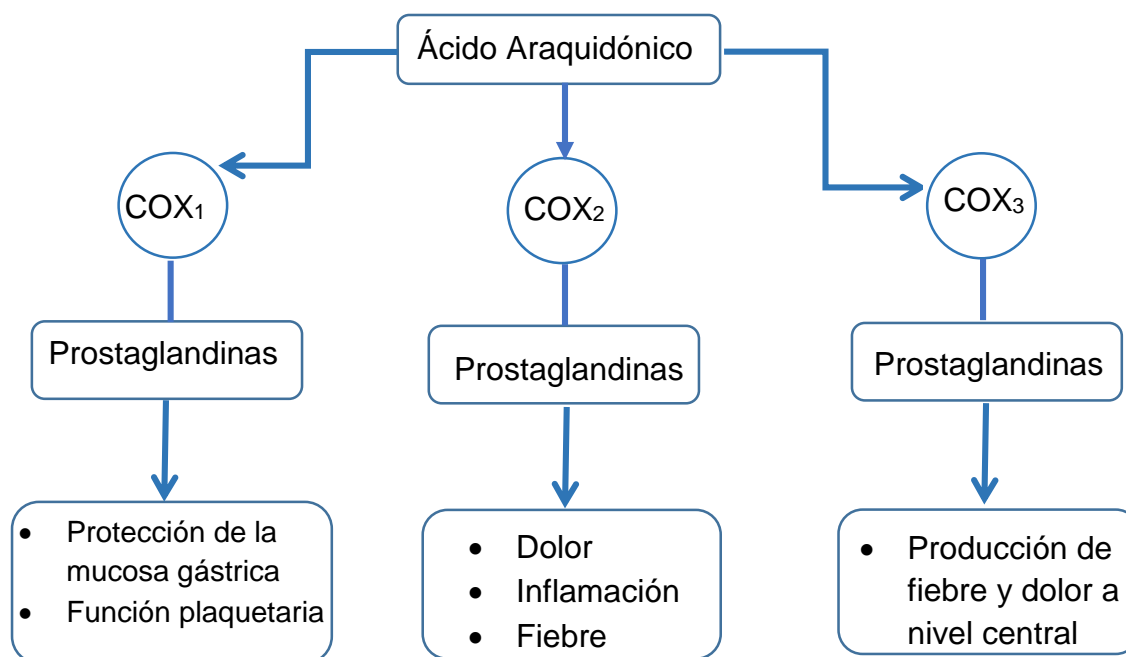


Figura 1.2 Funciones de la COX

En los procesos de inflamación los derivados de la vía de la ciclooxigenasa (fundamentalmente, las prostaglandinas del tipo E y la PGI₂) favorecen la vasodilatación prolongada y aumentan el flujo sanguíneo en la microcirculación al mismo tiempo que potencian la acción de otros mediadores como bradicinina y serotonina, capaces de incrementar la permeabilidad vascular y activar las terminaciones nerviosas provocando la hinchazón y un aumento de la presión local que originan el dolor [23].

Los fármacos capaces de inhibir con mayor o menor potencia y especificidad las isoformas de la ciclooxigenasa y como consecuencia la síntesis de prostaglandinas se conocen como antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). El AAS es un ejemplo claro de este grupo. Los AINEs bloquean el sitio de unión del ácido araquidónico en la enzima, lo que evita su conversión en prostaglandinas.

El AAS es un inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas, acetila de forma irreversible covalente a la COX, de forma que su efecto dura mucho más, ya que se tienen que sintetizar nuevas moléculas de esta para que reemplacen a las enzimas modificadas por el fármaco. Cuando la COX-1 es acetilada por el AAS, el sitio de unión para el ácido araquidónico queda bloqueado, inhibiendo la síntesis de prostaglandinas y de Tromboxano A₂ (TXA₂), por esta razón, es el prototipo de fármaco para prevenir la agregación plaquetaria. La inhibición de la COX-2 por el AAS reduce la síntesis de las prostaglandinas E y F, prostaglandinas responsables de la vasodilatación y la permeabilidad capilar, lo que a su vez aumenta la movilidad de fluidos y leucocitos que son responsables de la inflamación, enrojecimiento y dolor. El AAS no solo disminuye la permeabilidad capilar sino que también reduce la liberación de enzimas destructoras de los lisosomas.

El paracetamol no es considerado un fármaco AINE porque tiene poca o nula acción como anti-inflamatorio y analgésico periférico y capacidad limitada de inhibición de la COX-1 y COX-2. Sin embargo, al inhibir selectivamente a la COX-3 es el tratamiento de elección como analgésico del SNC y antipirético, en particular cuando el AAS está contraindicado.

La oxidación del paracetamol produce la formación del metabolito altamente reactivo N-acetil-p-benzoquinonimida (NAPQI). El NAPQI se combina rápidamente con glutatión y con otros compuestos que contienen tioles formando conjugados no tóxicos que se eliminan por orina. Cuando la formación de NAPQI sobrepasa la

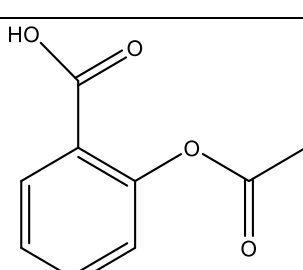
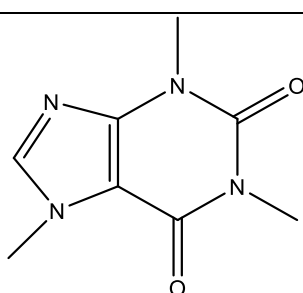
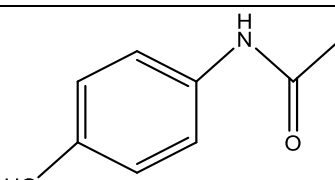
GSH el NAPQI libre se une a las proteínas intracelulares del hepatocito causando necrosis hepática [24].

La cafeína es una xantina de origen natural, presente en el café, utilizada como estimulante del sistema nervioso central o como estimulante respiratorio. La cafeína cruza fácilmente la barrera hematoencefálica, una vez en el cerebro el principal modo de acción es como un antagonista de los receptores de adenosina. El bloqueo de dichos receptores por parte de la cafeína aumenta rápidamente los niveles de noradrenalina en diversas estructuras nerviosas estimulando la actividad locomotora. También estimula la secreción gástrica de ácido, aumenta el flujo sanguíneo renal y tiene propiedades diuréticas moderadas. [25]

En general la cafeína disminuye el cansancio y la fatiga. Se combina con analgésicos o derivados del alcaloide ergotamina para el tratamiento de la migraña y otros tipos de cefalea.

La tabla 1.2 muestra la estructura química de los tres principios activos que contienen los medicamentos estudiados en esta tesis.

Tabla 1.2 Estructura química de AAS, paracetamol y cafeína.

Estructura	Nombre IUPAC	Nombre común
	Ácido 2-(acetiloxi)-benzoico	Ácido acetilsalicílico (AAS)
	1,3,7-trimetil-1 <i>H</i> -purina 2,6(3 <i>H</i> ,7 <i>H</i>)-diona 1,3,7-trimetilxantina	Cafeína
	N-(4-hidroxifenil)acetamida N-(4-hidroxifenil)etanamida	Paracetamol

Capítulo II.

Parte experimental

La parte experimental se dividió en cinco etapas: Extracción de los principios activos de Bioelectro®, Tempra® ES3, y Paracetamol®, análisis cromatográfico, validación de un método cromatográfico por HPLC, cuantificación de ácido salicílico y por último pruebas de degradación a Bioelectro®.

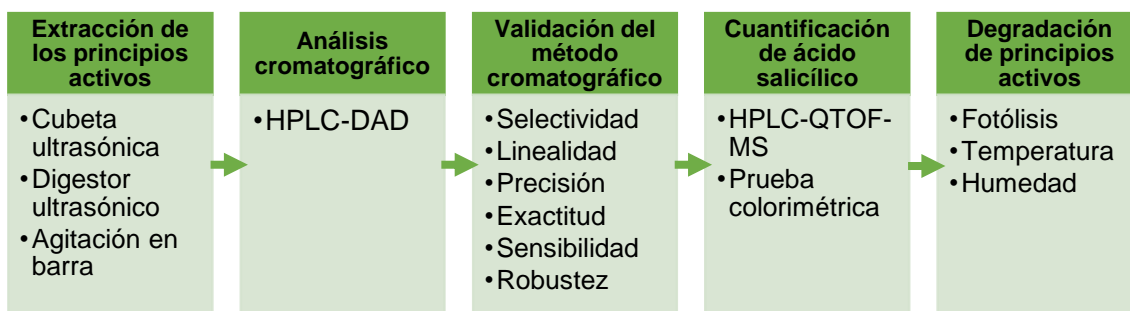


Figura 2.1 Esquema general de trabajo

2.1 Extracción de principios activos

De cada uno de los medicamentos se determinó el peso promedio de una tableta. Se trituraron 20 tabletas y se tomó el peso equivalente a una para realizar las extracciones.

El contenido de principios activos en una tableta de cada medicamento es:

Bioelectro®: 250 mg de ácido acetilsalicílico, 250 mg de paracetamol y 65 mg de cafeína.

Tempra® ES3: 500 mg de paracetamol y 65 mg de cafeína.

Paracetamol genérico: 500 mg de paracetamol.

En los tres fármacos el polvo se llevó a un matraz aforado de 100 mL y se disolvió con 80 mL de fase móvil, descrita en la sección de análisis cromatográfico. La mezcla se extrajo por cubeta ultrasónica, agitación en barra y digestor ultrasónico durante 10 minutos respectivamente a temperatura ambiente. Concluido el tiempo se aforó con la fase móvil.

Se tomó una alícuota de la solución y se filtró utilizando filtros PTF-membrane 0.2 µm. Un mililitro de la solución filtrada se pasó a un matraz aforado de 10 mL y se aforo nuevamente con fase móvil.

2.2 Análisis cromatográfico

El análisis se hizo en un equipo HPLC Agilent 1260 con detector UV-VIS e inyector automático. La detección UV se realizó a 236, 246 y 280 nm. Se utilizó una columna Ultrasphere ODS (4.6mm x 7.5cm) de Beckman. La composición de la fase móvil fue, A: H₂O + ácido fórmico 0.1% y B: MeOH + ácido fórmico 0.1%. Se empleó un método isocrático 40% de B a una velocidad de flujo de 1 mL/min con un volumen de inyección de 25 µL y un tiempo de análisis de 6 minutos.

2.3 Validación del método cromatográfico

2.3.1 Selectividad

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debido a la presencia del analito, es decir que el grado de respuesta de nuestro método es únicamente proporcionado por el analito y no por algún interferente del producto que se analiza, como pueden ser los excipientes de un fármaco, productos de degradación, subproductos de la síntesis de una droga, etc.

En cromatografía líquida determinar el tiempo de retención no es suficiente para asegurar la selectividad del ensayo. Además debe observarse que en el pico cromatográfico la señal corresponda a un solo analito; por ejemplo, tomar el espectro en varias partes del pico sin que se observen diferencias.

Se analizaron las muestras de Bioelectro®, Tempra® ES3, Paracetamol genérico y los estándares de paracetamol, AAS y cafeína con el método cromatográfico descrito anteriormente. Los espectros de los picos cromatográficos de los estándares se compararon con los principios activos de los medicamentos y se verificó la coincidencia del tiempo de retención.

2.3.1.1 Aptitud del sistema

Estas pruebas se emplean para verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico son adecuadas para el análisis que se va a realizar. Se calculó la aptitud del sistema como se describe a continuación:

- **Factor de capacidad (k')**: Describe las velocidades de migración de los analitos en las columnas. Este factor determina la retención de un soluto y se calcula como:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad 2.1$$

En donde t_R es el tiempo de retención del soluto y t_0 es el tiempo muerto.

- **Selectividad (α):** Depende de la naturaleza química de los componentes de la muestra, la fase estacionaria y la fase móvil, a medida que aumenta α , la separación del pico cromatográfico se da hasta la base, por lo tanto cuando $\alpha > 1$ la separación es alcanzable.

Es el cociente entre los factores de capacidad (k') de un par de picos (1 y 2).

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad 2.2$$

- **Eficiencia:** Se expresa como una cantidad adimensional llamada número efectivo de platos teóricos (N). Es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, además se relaciona con la manera en que ha sido empacada una columna. N debe ser >2000 .

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad 2.3$$

Donde w es el ancho del pico en la base.

- **Resolución (R):** Describe la separación entre los centros de los picos tomando en cuenta la anchura de estos. La resolución entre cualquiera de los picos del cromatograma debe ser mayor a 1.4. Este parámetro se calculó con la fórmula:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad 2.4$$

Donde w_2 y w_1 es el ancho de los respectivos picos en la base.

- **Asimetría (T):** La asimetría puede encontrarse en la parte anterior o posterior respecto al tiempo máximo de retención del pico (figura 2.2). Los picos perfectamente gaussianos son poco frecuentes, pero la magnitud de esa desviación es la que determina que pueda o no tolerarse. En general no debe aceptarse un método que presente picos con asimetría superior a 1.5 tomada al 5% de altura.

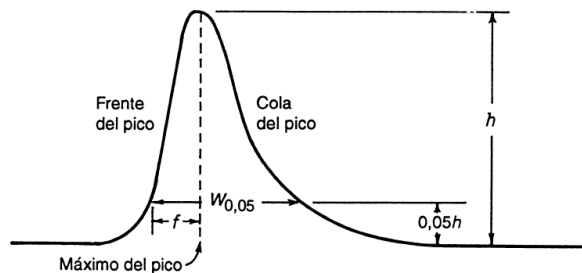


Figura 2.2. Pico cromatográfico asimétrico.

Para el calcular este parámetro se utilizó la siguiente fórmula:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad 2.5$$

2.3.2 Linealidad

Se define como la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta dentro de un rango lineal. El intervalo entre la concentración mínima y máxima de analito que puede medirse por interpolación en una curva estándar. Los criterios de aceptación para linealidad se encuentran en la tabla 2.1.

Se realizó una curva de calibración de ácido acetilsalicílico (50-500 mgL⁻¹), paracetamol (10-140 mgL⁻¹) y cafeína (20-100 mgL⁻¹). Cada punto de las curvas de calibración se inyectó por triplicado.

Tabla 2.1 Criterios de aceptación para linealidad

Parámetro estadístico	Ecuación	Criterio
R		≥0.99
r ²		≥0.98
Ecuación de la recta	$y = mx + b$	
Test de correlación lineal	$t_r = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$	$t_r > t_{\text{tabla}}$
Test de student de la pendiente	$t_m = \frac{ m }{S_m}$	$t_m > t_{\text{tabla}}$

2.3.3 Precisión

Expresa el grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor del valor medio o central y se expresa matemáticamente con la desviación estándar relativa (RSD).

La desviación estándar se calcula como:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 2.6$$

Donde n es número de medidas, x_i es el valor medido en el ensayo i y \bar{x} el estimado de la media poblacional.

$$RSD = \frac{S*100}{\bar{x}} \quad 2.7$$

La USP indica que la RSD debe ser menor al 2% inyectando 6 veces una solución estándar.

La precisión del método se evaluó con la desviación estándar relativa (RSD) de 6 inyecciones cromatográficas de AAS (500 mgL^{-1}), paracetamol (80 mgL^{-1}) y cafeína (100 mgL^{-1}).

2.3.4 Exactitud

La exactitud de un método analítico habla de la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia. La exactitud debe ser tan grande como sea posible para que el valor se aproxime al de referencia.

Para determinar la exactitud se emplearon tres concentraciones de AAS ($200, 250, 300 \text{ mgL}^{-1}$) cafeína ($40, 60, 80 \text{ mgL}^{-1}$) y paracetamol ($20, 40, 60 \text{ mgL}^{-1}$) y se inyectaron por triplicado. Se utilizó un ensayo t de student para calcular el parámetro estadístico t_{ob} , que se comparó con el valor reportado en tablas para $n-1$ grados de libertad en el nivel de confianza del 95%.

Si $t_{ob} < t_{tabla}$, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada.

$$R\% = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} * 100 \quad 2.8$$

$$t_{ob} = \frac{[100-R\%]}{RSD*\sqrt{n}} \quad 2.9$$

Donde $R\%$ es la recuperación porcentual.

2.3.5 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo.

Limite de detección: Corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración. Su determinación puede efectuarse cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 o 3.

Limite de cuantificación: Es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud y se expresa también en unidades de concentración. Se mide la señal de fondo (relación señal/ruido) efectuando mediciones repetidas sobre un blanco o placebo. Se mide su desviación estándar y se calcula el límite de cuantificación multiplicando esa desviación estandar por un factor, generalmente igual a 10.

Para determinar estos parámetros se prepararon diluciones 1:50, 1:70 y 1:100 de la solución de Bioelectro® (AAS 250 mgL⁻¹, paracetamol 250 mgL⁻¹ y cafeína 65 mgL⁻¹) y se hicieron 3 inyecciones cromatográficas de cada dilución.

Se realizó una curva de calibración, graficando la concentración vs área y se determinó el intercepto Y_b de la ecuación de la línea recta de esta nueva curva de calibración.

Se hizo la desviación estandar de la concentración y se calculó la recta correspondiente a concentración vs desviación estándar para determinar el intercepto S_b.

$$\text{Limite de detección: } \frac{Y_b + 3 * S_b}{b} \quad 2.10$$

$$\text{Limite de cuantificación: } \frac{Y_b + 10 * S_b}{b} \quad 2.11$$

Donde b es la pendiente de la ecuación de curva de calibración de AAS (50-500 mgL⁻¹), paracetamol (10-80 mgL⁻¹) o cafeína (20-100 mgL⁻¹).

2.3.6 Robustez

La robustez de un método analítico es la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios a las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

Para determinar la robustez se observó el desempeño del sistema ante los siguientes cambios

1.-Cambio de composición de la fase móvil: A: H₂O; B: MeOH + 0.1% ácido fórmico; 40% B.

2.-Cambio en el régimen isocrático y composición de fase móvil: A: H₂O + 0.1% ácido fórmico; B: MeOH + 0.1% ácido fórmico; 30% B.

Se estudió la influencia de los cambios mencionados sobre los parámetros cromatográficos eficiencia (N), resolución (R) y asimetría (T).

2.4 Degradación de los principios activos de Bioelectro®

2.4.1 Fotólisis

Se tomó el peso equivalente a 250 mg de AAS, 250 mg de paracetamol y 65 mg de cafeína. El polvo se llevó a un matraz aforado de 100 mL y se aforo con agua.

La figura 2.3 muestra el esquema del equipo utilizado en fotólisis. La solución se colocó en el reactor y se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo: 0, 1, 3, 5, 7 y 9 horas. Las muestras se analizaron por HPLC.

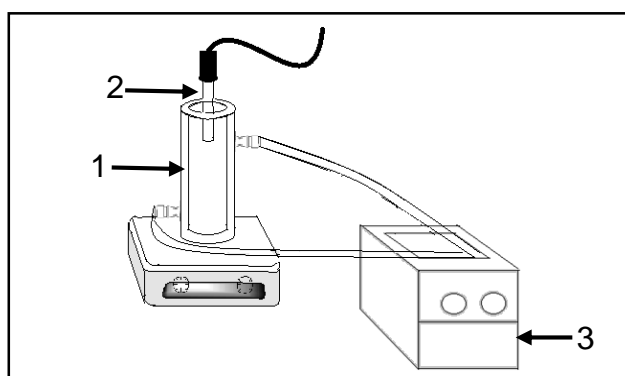


Figura 2.3. (1) Reactor tesmostatizado, (2) lámpara UV a 254 nm y (3) sistema de enfriamiento por reflujo.

2.4.2 Humedad y temperatura

Se colocó una tableta de Bioelectro® en un desecador con una solución de ácido sulfúrico al 10% para generar una humedad relativa de 75% a 26°C (figura 2.4) y se dejaron en este ambiente 50 días. Concluido el tiempo se trituró la tableta en un mortero. El polvo se disolvió en 80 mL de fase móvil en un matraz aforado de 100 mL. Se extrajo por agitación en barra durante 10 minutos y se aforo con la fase móvil.

Para el análisis cromatográfico se tomó una alícuota de la muestra y se filtró utilizando filtros PTF-membrane 0.2 µm.

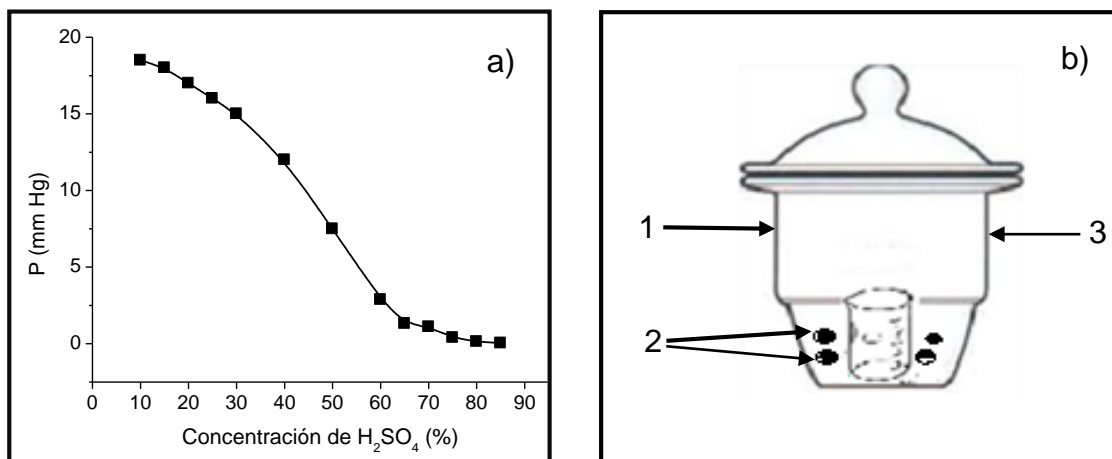


Figura 2.4. a) Curva de presión de vapor de disoluciones de H₂SO₄. b) Higrostató utilizado para la prueba de humedad: desecador (1), tabletas de Bioelectro® (2), vaso de precipitado con solución de ácido sulfúrico al 10% (3).

Para evaluar la estabilidad de los principios activos de Bioelectro® con la temperatura se colocaron cuatro tabletas Bioelectro® en una estufa a 50°C. Se tomaron muestras a las 6, 12, 24 y 240 horas. Con cada tableta se siguió el mismo procedimiento de extracción utilizado en humedad.

Capítulo III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Extracción de principios activos

En la figura 3.1 se muestra los cromatogramas correspondientes a las extracciones de los principios activos de Bioelectro®, Tempra ES3® y Paracetamol genérico por tres métodos diferentes.

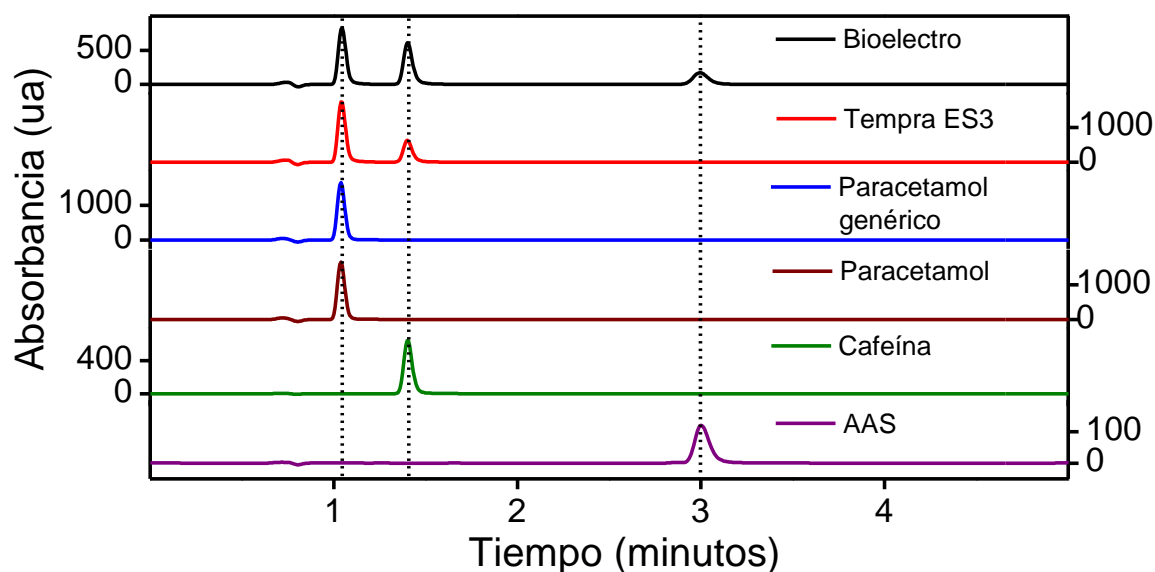


Figura 3.1. Cromatogramas de extracción de Bioelectro®, Tempra ES3® y Paracetamol genérico comparando los picos de los estándares de paracetamol, cafeína y AAS.

En la tabla 3.1 se puede observar el porcentaje de extracción de los principios activos por diferentes métodos. La agitación en barra (M1) fue el método con el que se obtuvo un mayor porcentaje de extracción en los tres medicamentos seguido del digestor ultrasónico (M2) y la cubeta ultrasónica (M3).

Tabla 3.1 Porcentaje de extracción de los principios activos de Bioelectro® Tempra® y Paracetamol genérico.

	Método de extracción	% de extracción		
		Paracetamol	Cafeína	AAS
Bioelectro®	M1	96	97	97
	M2	95	77	97
	M3	89	77	96
Tempra ES3®	M1	99	94	-
	M2	98	93	-
	M3	96	87	-
Paracetamol genérico	M1	99	-	-
	M2	99	-	-
	M3	99	-	-

3.2 Validación del método cromatográfico

3.2.1 Selectividad

La selectividad es la capacidad del método cromatográfico de separar los analitos de interés en una muestra. El grado de respuesta de cada analito dependerá únicamente de este y no por la interferencia de otros compuestos. En la figura 3.2 se muestra solo el cromatograma correspondiente a la extracción de los principios activos de Bioelectro® (por contener los tres principios activos estudiados) y los estándares de paracetamol, cafeína y AAS. Los espectros de los picos cromatográficos de Bioelectro® y los estándares se muestran en la figura 3.2 b.

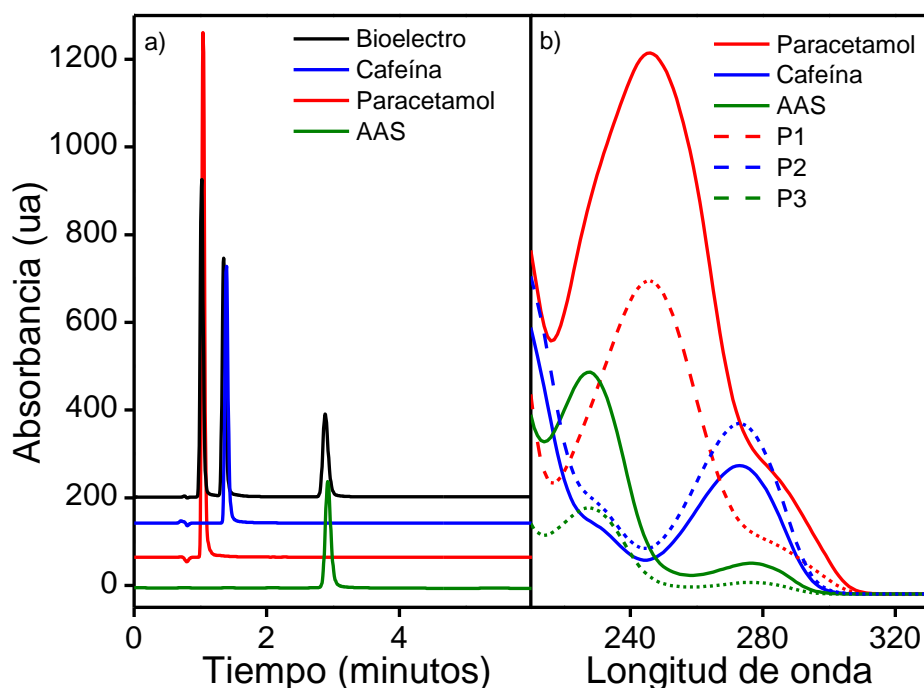


Figura 3.2 a) Cromatograma de los componentes de Bioelectro® y los estándares de paracetamol (P1), cafeína (P2) y AAS (P3). b) Espectros UV-visibles de los picos cromatográficos.

Comparando los espectros y los tiempos de retención mostrados en la tabla 3.2, se puede concluir que los picos observados en los cromatogramas de Bioelectro®, Tempra®, y paracetamol genérico corresponden a: pico 1 paracetamol, pico 2 cafeína y pico 3 AAS.

Tabla 3.2 Tiempos de retención de los picos correspondientes a los principios activos de Bioelectro®, Tempra®, paracetamol genérico.

Medicamento	Tiempo de retención (minutos).		
	Paracetamol	Cafeína	AAS
Bioelectro®	1.04	1.39	2.90
Tempra ES3®	1.01	1.34	-
Paracetamol genérico	1.01	-	-

3.2.1.1 Aptitud del sistema

El resultado de los cálculos de aptitud del sistema se encuentra en la tabla 3.3. El método desarrollado cumple con los criterios de aceptación.

Tabla 3.3 Parámetros cromatográficos calculados para aptitud del sistema

Parámetros	α	R	T	N
Criterios de aceptación	>1.5	>1.4	<1.2	>2000
Paracetamol	-	-	0.83	4592
Cafeína	-	-	1.06	-
AAS	-	-	1	-
Paracetamol-Cafeína	2.26	7.25	-	-
Cafeína-AAS	3.45	22.5	-	-

3.2.2 Linealidad

El rango lineal es el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima en la cual la respuesta del analito es proporcional a la concentración. En la figura 3.3 se muestran las gráficas de las curvas de calibración concentración (mgL^{-1}) contra absorbancia (ua) de paracetamol, cafeína y AAS. En el caso de paracetamol se analizaron concentraciones hasta 140 mgL^{-1} y se observó que el intervalo de linealidad fue de 10 a 80 mgL^{-1} .

Los parámetros de linealidad se encuentran en la tabla 3.4. Los valores de coeficiente de correlación para los tres fármacos son mayores a 0.99. Sin embargo no es suficiente para establecer la linealidad de los resultados, así que se calculó el valor t_r correspondiente al test de correlación lineal. En donde si $t_r > t_{\text{tabla}}$ indica una correlación lineal significativa como se observó para los tres fármacos analizados.

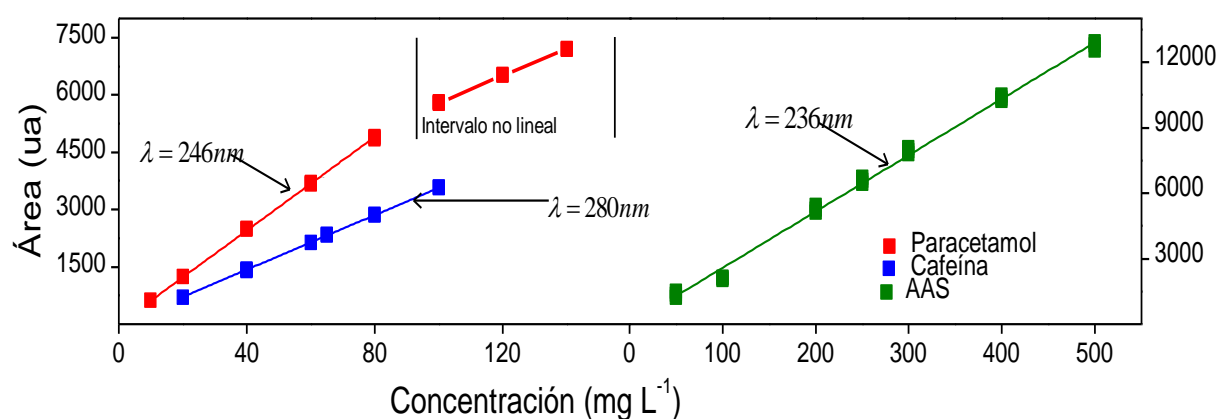


Figura 3.3. Curva de calibración de cafeína y paracetamol (eje izquierdo) y AAS (eje derecho) medidos a la longitud de onda de máxima absorbancia de cada compuesto.

La pendiente se encuentra relacionada con la sensibilidad del método, de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad. El test de student para la pendiente (t_m) trata de comprobar que la pendiente difiere significativamente de cero. Para paracetamol, cafeína y AAS t_m difiere de cero en los tres casos y la pendiente es mayor en paracetamol y cafeína.

Tabla 3.4 Parámetros de la linealidad para: paracetamol, cafeína y AAS.

Parámetros	Paracetamol	Cafeína	AAS
Pendiente	60.78	35.91	26.02
Ecuación	$Y=60.78x+28.55$	$Y=35.91-16.84$	$Y=26.02-73.39$
Coeficiente (r)	0.999	0.999	0.998
t_{tabla}	1.753	1.746	1.729
Test de correlación lineal (t_r)	243.062	338.041	66.966
Test de Student de la pendiente(t_m)	254.77	382.021	21.481

El valor t_{tabla} para 13, 16 y 19 grados de libertad para paracetamol, cafeína y AAS respectivamente y $\alpha=0.05$. En todos los casos se cumplió el supuesto de linealidad.

3.2.3 Precisión

En la tabla 3.5 se muestran los resultados del análisis de precisión del método. La desviación estándar relativa (RSD) es menor al 2% en los tres principios activos, por lo que cumple con lo establecido en la USP.

Tabla 3.5 Resultados de precisión para AAS, paracetamol y cafeína.

Parámetros	Paracetamol	Cafeína	AAS
S	23.23	2.16	31.19
RSD	0.48	0.06	0.25

3.2.4 Exactitud

Se realizó la prueba t de student utilizando las ecuaciones 2.8 y 2.9 para determinar que no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada. Los resultados referentes a este parámetro se encuentran en la tabla 3.6. Se puede observar que el método presenta exactitud para los tres fármacos, pues el valor de t_{ob} fue menor que el valor de t_{tabla} (para n-1 grados de libertad y $\alpha=0.05$)

Tabla 3.6 Resultados de exactitud para AAS, paracetamol y cafeína.

Parámetros	AAS	Paracetamol	Cafeína
t_{ob}	1.693	0.785	0.321
t_{tabla}	2.306	2.306	2.306

3.2.5 Sensibilidad

En la tabla 3.7 se presentan los resultados de límite de detección y límite de cuantificación de los tres fármacos. La pendiente es proporcional a la sensibilidad del método. En el caso de paracetamol y cafeína las cantidades que se pudieron detectar y cuantificar son del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ mientras que para AAS son mg L^{-1} .

Tabla 3.7 Resultados de límite de detección y límite de cuantificación para: paracetamol, cafeína y AAS.

Parámetros	Paracetamol $\mu\text{g L}^{-1}$	Cafeína $\mu\text{g L}^{-1}$	AAS mg L^{-1}
Límite de detección	10.63	22.68	1.86
Límite de cuantificación	19.73	75.61	6.21

3.2.6 Robustez

Se estudiaron los valores de eficiencia (N), resolución (R) y asimetría (T) ante cambios de composición y régimen de la fase móvil. Es importante estudiar la robustez de un método ya que, en caso de variaciones significativas se debe especificar que parámetros requieren un mayor cuidado.

En la tabla 3.8 se compara los valores de N, R y T del método cromatográfico utilizado con respecto a las siguientes variables:

Método: A: H₂O + 0.1% ácido fórmico; B: MeOH + 0.1% ácido fórmico; 40% B.
 Variante 1: A: H₂O; B: MeOH + 0.1% ácido fórmico; 40% B.
 Variante 2: H₂O + 0.1% ácido fórmico; B: MeOH + 0.1% ácido fórmico; 30% B.

Tabla 3.8 Parámetros cromatográficos calculados para el estudio de robustez.

	Método	Variante 1	Variante 2
R_{1-2}	7.25	80	35
R_{2-3}	22.5	2.02	40.5
N	4592	2090	2500
$T_{\text{paracetamol}}$	0.83	1.5	1
$T_{\text{Cafeína}}$	1.06	0.96	0.81
T_{AAS}	1.01	2.23	1.08

El parámetro más afectado fue la simetría del pico tres en la variante 1. En la figura 3.4 se muestran los cromatogramas de cada método, como se puede observar el pH es un factor importante. Cuando solo a MeOH se le agregó ácido fórmico el pico correspondiente a ácido acetilsalicílico presenta cola y una asimetría de 2.23. Esto puede llevar a errores en la cuantificación del principio activo. Con los resultados ya mencionados el método utilizado es más robusto en la variante 2 que en la variante 1.

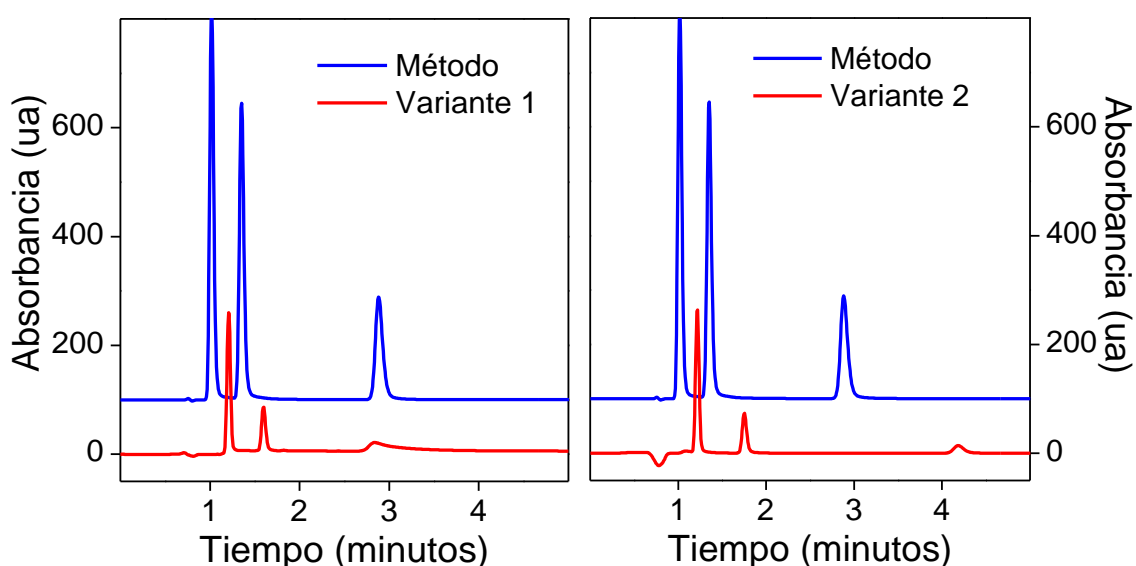


Figura 3.4 Cromatogramas correspondientes a las variantes realizadas en el método cromatográfico.

3.3 Cuantificación de ácido salicílico

El ácido salicílico es un ácido orgánico producto de la hidrólisis del AAS, el cual es altamente irritante para la mucosa gástrica. Contiene en su molécula un grupo fenólico, por tal motivo su identificación es posible con una reacción colorimétrica con cloruro férrico que permite determinar la presencia o ausencia de fenoles en una muestra dada (figura 3.5) [21].

El fundamento mismo de esta prueba no puede ser aplicada para la cuantificación de ácido salicílico en el medicamento Bioelectro®, debido a que paracetamol también presenta un grupo fenol en su estructura.

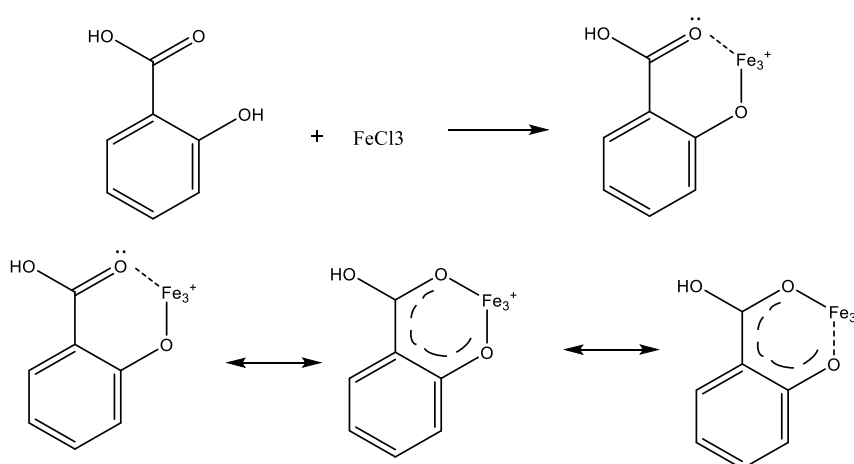


Figura 3.5 Reacción entre el fenol y el Fe₃Cl.

De acuerdo con la UPS 30 el cálculo del límite permitido de ácido salicílico en tabletas de paracetamol, AAS y cafeína se realiza con la siguiente ecuación:

$$1000 \left(\frac{c}{a} \right) \left(\frac{r_0}{r_s} \right) \quad 3.1$$

Donde c es la concentración en mg por mL del estándar de referencia de ácido salicílico, a es la cantidad en mg de AAS en la porción de tabletas tomada, r₀ y r_s son las respuestas (área) de los picos de ácido salicílico en las tabletas y en el estándar respectivamente. Ácido salicílico no debe estar en más del 3% con respecto al pico cromatográfico de AAS.

En el análisis efectuado se encontró el 0.57% de ácido salicílico, por lo tanto las tabletas de Bioelectro® cumplen con el límite de ácido salicílico establecido por la

USP. Además de determinar el porcentaje de esta impureza se realizó su cuantificación en HPLC-QTOF-MS. La figura 3.6 a) muestra la curva de calibración descrita por la ecuación $C = (\text{área} + 25124) / 15036$ y b) el cromatograma de Bioelectro® con ácido salicílico.

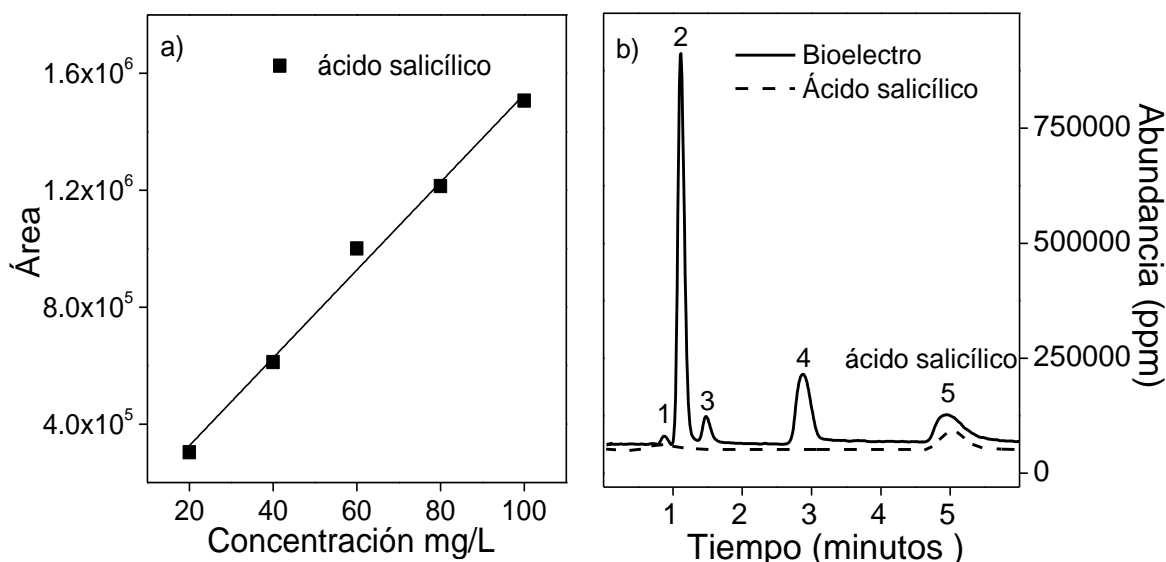


Figura 3.6 a) Curva de calibración de ácido salicílico en y b) cromatograma de una muestra de Bioelectro® y ácido salicílico utilizando un detector QTOF-MS polaridad negativa.

La concentración de ácido salicílico en una tableta de Bioelectro® determinada por HPLC-QTOF-MS fue de 101.21 mg/L en una inyección de 100 μ L que representa el 0.57% del tamaño del pico con respecto a AAS. El detector de masas es más sensible que el de arreglo de diodos por ello fue posible observar una mayor concentración del ácido salicílico.

3.4 Degradación de los principios activos de Bioelectro®

La estabilidad de los principios activos es el principal criterio para determinar la aceptación o rechazo de cualquier medicamento. Existen varias formas de inestabilidad para dar pie al rechazo de algún producto.

- Degradación química del principio activo.
- La formación de un producto tóxico resultante del proceso de descomposición.
- Inestabilidad que puede disminuir la biodisponibilidad del fármaco

La muestra de Bioelectro® se analizó por HPLC-QTOF-MS (figura 3.7) utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 2.1. Las condiciones de detección utilizadas fueron: polaridad positiva y negativa, temperatura del gas de secado 350°C, flujo del gas 11 Lmin⁻¹, presión del nebulizador 60 psi, voltaje del capilar de 3500 V, voltaje del fragmentor 175 V, skimmer 65 V, octopolo 750 V.

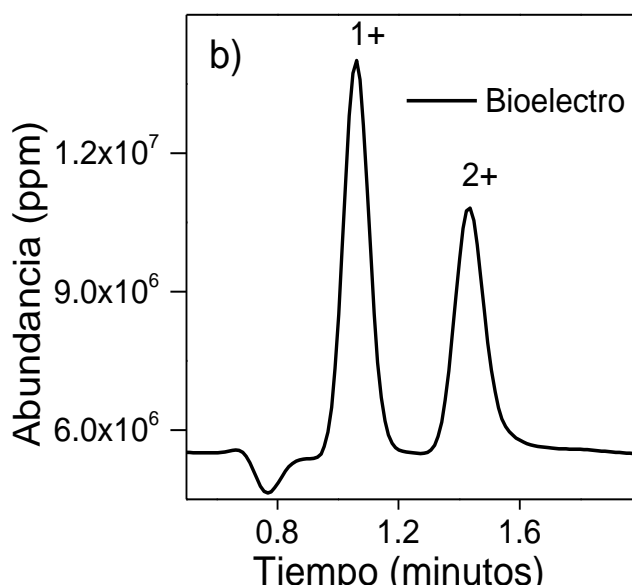


Figura 3.7 Cromatograma los componentes de Bioelectro® ionizados positivamente.

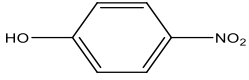
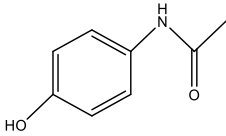
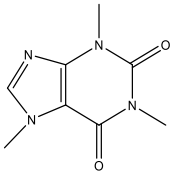
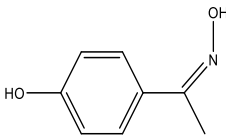
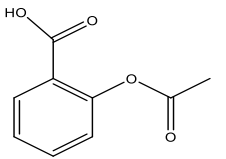
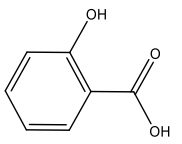
La sensibilidad del detector de masas es mayor que la del detector UV-VIS, por ello fue posible identificar impurezas generadas de la síntesis de paracetamol no observadas anteriormente [22,23].

Las masas obtenidas del análisis se representaron como los posibles fragmentos de las moléculas originales. Se calculó la exactitud de masa de las estructuras propuestas con la siguiente ecuación:

$$\Delta m/z = \frac{m/z_{teórica} - m/z_{experimental}}{m/z_{teórica}} \times 10^6 \quad 3.3$$

La tabla 3.9 muestra la relación m/z de los picos y $\Delta m/z$ de cada uno.

Tabla 3.9. Relación m/z de los componentes de Bioelectro®, el signo que precede al número de pico corresponde a la polaridad en que fue observado.

Pico	t _R minutos	m/z experimental	m/z teórica	Δ m/z	Nombre	Estructura
1-	0.88	138.0201	138.0196	3.6	4-Nitrofenol	
1+	1.061	171.1393	-	-	-	No determinada
2-	1.11	150.056	150.056	0	Paracetamol	
2+	1.436	195.1897	195.1877	10.24	Cafeína	
3-	1.48	150.0547	150.056	8.6	4-Hydroxi acetofenona oxima	
4-	2.88	179.0356	179.035	3.35	Ácido acetilsalicílico	
5-	4.95	137.0244	137.0242	1.45	Ácido salicílico	

3.4.1 Fotólisis

En la figura 3.8 se muestra una fotografía en donde se compara una solución de Bioelectro® antes y después de la fotólisis, como se puede observar en la figura a, la solución presentó una coloración marrón a partir las 5 horas de exposición a la lámpara UV.

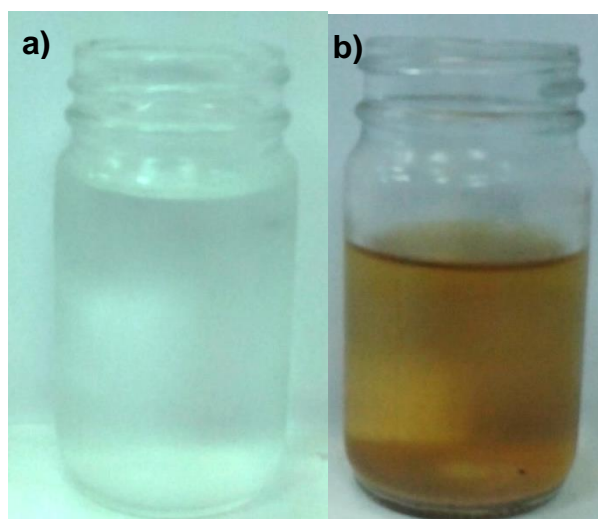


Figura 3.8 Fotografía a) Bioelectro® en solución t_0 y b) Bioelectro® t_9 después de la fotólisis.

La luz normal del sol o la de iluminación de interiores puede ser responsable de la degradación de algunas moléculas de fármacos. Estas son reacciones que se asocian comúnmente a la oxidación donde la luz se considera el iniciador de la reacción. La figura 3.9 muestra un cromatograma de la fotólisis de Bioelectro a diferentes tiempos donde se puede apreciar la formación de un producto del pico 2 y el crecimiento del pico 5 con respecto a t_0 debido a la hidrólisis del AAS.

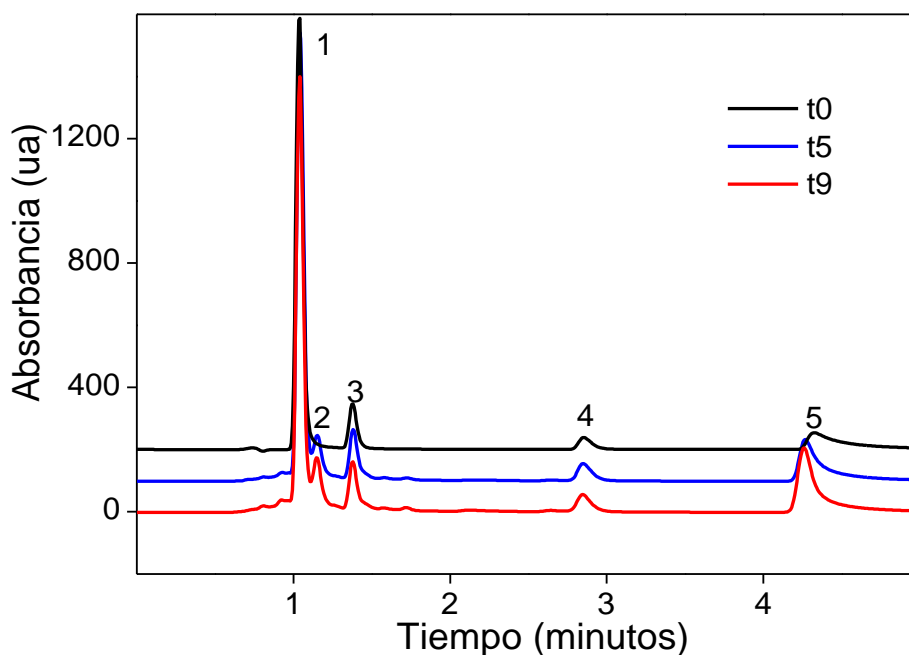


Figura 3.9 Cromatogramas de la fotólisis de Bioelectro® a tiempo 0, 5 y 9 horas analizados a 300 nm. Paracetamol (pico 1), producto (pico 2), cafeína (pico 3), AAS (pico 4) y ácido salicílico (pico 5).

Se obtuvieron los espectros de los picos cromatográficos y se compararon con la muestra antes de la fotólisis. Como se puede apreciar en la figura 3.10 el pico 1 (paracetamol) y el pico 4 (AAS) presentan cambios en la intensidad del espectro por efecto de la concentración. Sin embargo se conservan el mismo número de bandas.

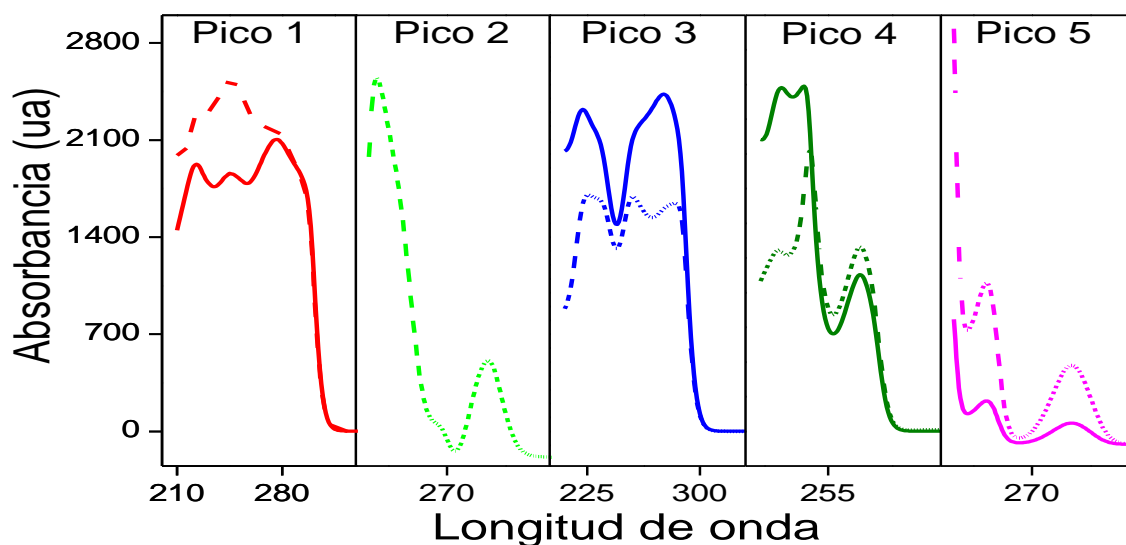


Figura 3.10 Espectros de los picos correspondientes al cromatograma de fotólisis. Línea continua corresponde a t_0 , línea punteada a t_9 .

Para la identificación de los posibles productos de degradación, la muestra de fotólisis t9 se analizó en un detector QTOF-MS (figura 3.11). Dado que la sensibilidad de este detector es mayor que en UV-VIS se encontraron 10 productos de degradación, de los cuales 8 se encuentran reportados en la bibliografía (tabla 3.10) [22, 24-29].

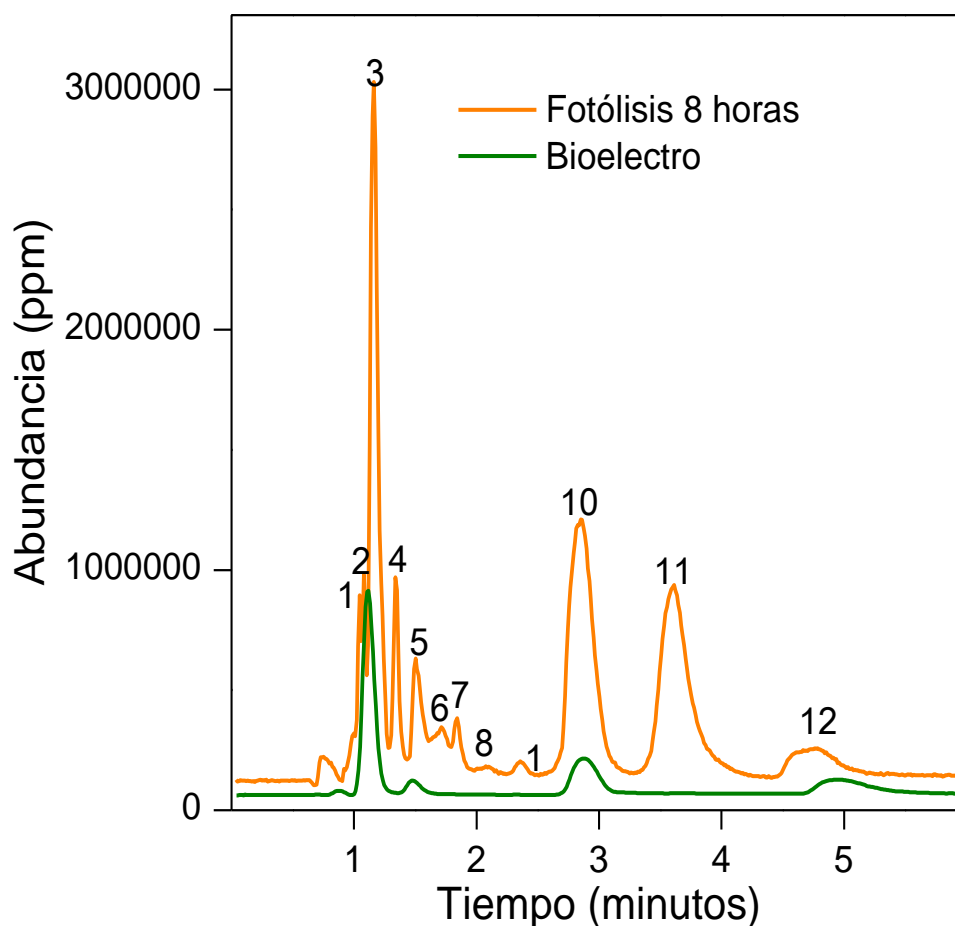
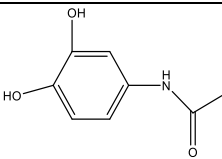
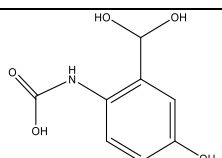
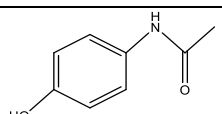
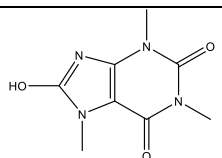
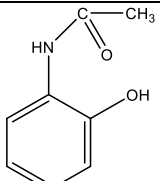
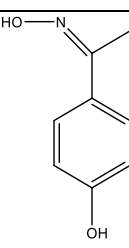
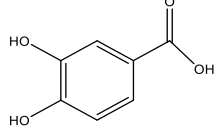
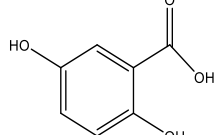
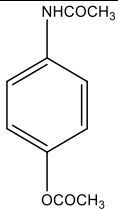
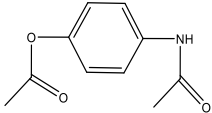
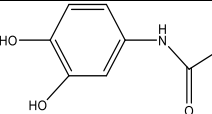
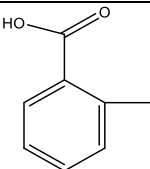
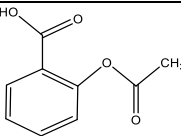
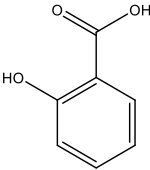


Figura 3.11 Cromatograma de la fotólisis de Bioelectro® después de 9 horas analizado por HPLC-QTOF-MS

Tabla 3.10. Relación m/z de los componente de Bioelectro® en fotólisis.

Pico	t _R	m/z _{exp.}	m/z _{teo.}	Δm/z	Nombre	Compuesto
1 [22]	1.036	166.0499	166.0509	6.02	3- Hidroxiacetamino fen	
2	1.083	198.0397	198.0407	5.04	(2- (dihidroxi metil)-4- hidroxifenil)ácido carbámico	
3	1.165	150.056	150.056	0	Paracetamol	
4 [24] [25]	1.341	209.0667	209.0679	5.73	Ácido 1,3,7- trimetilúrico	
5 [22]	1.505	150.0548	150.0560	7.99	N-(2-Hidroxi fenil) acetamida	
[22]			150.0560	7.99	4-Hidroxi- acetofenona oxima	
6 [26]	1.704	153.0179	153.0193	9.1	3,4-ácido- dihidroxi benzoico	
7 [27]	1.845	153.0184	153.0193	5.88	Ácido gentísico	

8	2.067	192.0655	192.0665	5.20	Diacetil-p-aminofenol	
[28]						
[29]						
[22]			192.0666	5.72	4-acetoxi-acetanilida	
9	2.360	166.0498	166.0509	6.62	3-Hidroxi-acetaminofen	
[22]						
10	2.841	135.0446	135.0451	3.70		
		179.0358	179.035	4.46	Ácido acetilsalicílico	
11	3.605	135.0446	135.0636	-	-	No determinada
		179.0341	179.0462	-	-	No determinada
12	4.681	137.0257	137.0244	9.48	Ácido salicílico	

3.4.2 Humedad y temperatura

Bioelectro® se sometió a las condiciones de humedad y temperatura ya descritas en la sección 2.4.2. La figura 3.12 muestra el cromatograma de Bioelectro® analizado en un detector QO-TOF. Comparando el cromatograma a tiempo cero de ácido salicílico y los correspondientes a temperatura y humedad se observó un cambio en el tiempo de retención del último pico.

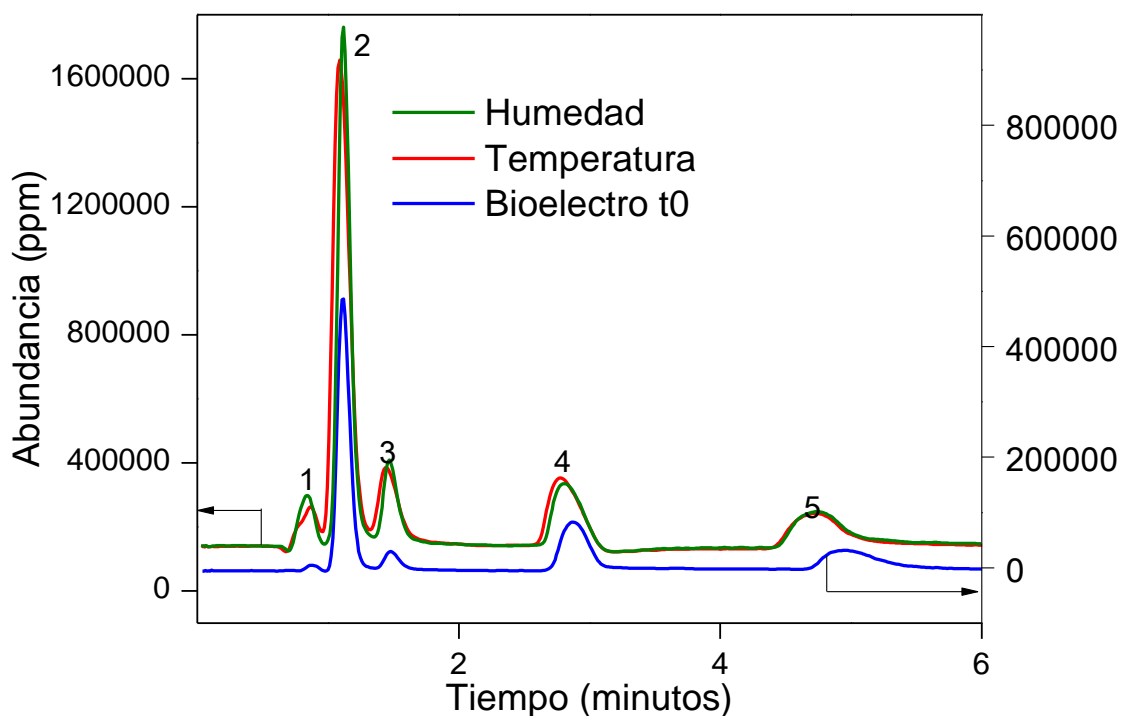


Figura 3.12 Cromatogramas de Bioelectro® en condiciones de temperatura y humedad analizado en un detector QO-TOF

Se observó que no hay generación de productos de degradación en condiciones de humedad y temperatura. Los picos detectados corresponden a los compuestos descritos en la figura 3.6 b cromatograma de una muestra de Bioelectro® utilizando un detector QTOF-MS polaridad negativa.

La masa del pico número 5 corresponde ácido salicílico, a pesar que el cromatograma anterior se observó que hay un cambio en el tiempo de retención, probablemente se debe a un cambio en la posición del grupo hidroxilo.

La HPLC con detector de masas es una técnica analítica que cada día tiene mayor relevancia en los estudios de calidad de fármacos pues permite detectar con mayor sensibilidad moléculas distintas a los principios activos cuya estructura puede elucidarse a partir de la masa observada.

Capítulo IV

CONCLUSIONES

- El método de extracción propuesto permitió la extracción de los principios activos de una manera sencilla y efectiva.
- El método analítico desarrollado y validado permitió la identificación de fármacos paracetamol, cafeína y AAS en los medicamentos comerciales Bioelectro®, Tempra ES3®, y paracetamol genérico.
- El método cromatográfico propuesto es selectivo, lineal, exacto, preciso y robusto.
- Por HPLC-QTOF-MS fue posible identificar productos derivados de la síntesis de paracetamol no observados en un detector acoplado a arreglo de diodos.
- Los probables compuestos de degradación en fotólisis son producto de reacciones de oxidación e hidrólisis del paracetamol mayoritariamente.
- No se observaron productos de degradación por exposición de los medicamentos a condiciones de humedad y temperatura en el intervalo estudiado en este trabajo.

Capítulo V

Bibliografía

- [1] M. López-Sánchez, J. Triana-Méndez, F. Pérez-Galuán, M.E. Torres-Padrón, Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas, Universidad de las Palmas de gran Canaria, 2005.
- [2] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. James, Fundamentos de química analítica, Thomson, México, 2005.
- [3] Cromatografía <621>, USP 30-NF 25, Volumen 1.
- [4] O.A. Quattrocchi, S.A. Abelaria, R.F. Laba, Introducción a la HPLC, Artes gráficas farro, Buenos Aires 1992.
- [5] L. Huber, Validation of analytical methods, Agilent Technologies, Germany, 2010.
- [6] M. Levent-Altun, HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone, Turkish Journal Chemistry, 26(2002), 521.528.
- [7] J.T. Feaneta, d. Agbaba, S. Eroc, S. Pavkov, M. Aleksic, S. Vladimirov, HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenoparbital in tablets, II Farmaco, 57(2002), 709-713.
- [8] E. Deconinck, P.Y. Sacré, S. Baudewyns, P. Couselle, J. De beer, A fast ultra-high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl salicylic acid and/or antihistaminics, Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis 56(2011), 200-209.
- [9] Asociación española de farmacéuticos de la industria, Validación de métodos analíticos, Sociedad de Validación de Sistemas, Barcelona, 2001.
- [10] NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/073ssa105.html>
Página de consultada en el mes de enero de año 2015
- [11] L.S. Ospina de Nigris, El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos. Parte I, Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas, 22(1994), 7-12.
- [12] J. Swarbrick, Encyclopedia of pharmaceutical technology, Informa Healthcare, USA, 2007.

- [13] Formulación líquida inyectable de Paracetamol
<http://www.google.com/patents/WO2008009756A1?cl=es>
Página de internet consultada en el mes de diciembre de 2014
- [14] T. Koshy, J.L. Lach, Stability of aqueous solutions of N-acetyl-p-aminophenol, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1961), 113-118.
- [15] Diccionario de especialidades farmacéuticas: PLM
http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/bio_electro_tabletas/63/101/12397/210.
http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/tempra_es3_tabletas/31/101/
Página de internet consultada en el mes de diciembre de 2014.
- [16] Paracetamol
http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Paracetamol.htm
Página de internet consultada en el mes de diciembre de 2014.
- [17] B. Lorenzo-Velázquez, et. al, *Farmacología básica y clínica*, Editorial medica panamericana, Buenos Aires, 2008.
- [18] C. Pascuzzo-Lima, *Farmacología básica*, 2008.
http://bibmed.ucla.edu.ve/edocs_bmucla/MaterialDidactico/farmacologia/farmbasica.pdf
- [19] O.E. Pradilla-Vesga, Ciclooxygenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia, *Med UNAB*, 7(2004), 181-184.
- [20] J. Flórez, J.A. Armijo, A. Mediavilla, *Farmacología humana*, Masson, Barcelona, 1998.
- [21] C. Avendaño-López, *Introducción a la química farmacéutica*, Mc Graw-Hill/interamericana, Madrid, 2001.
- [22] R. Nageswara-Rao, A. Narasaruju, Rapid separation and determination of process-related substances of paracetamol using reverse-phase HPLC with photo diode array as a detector, *Analytical Science*, 22(2006), 287-292.
- [23] N. Villota, L.M. Camarero, J.M. Lomas, G. García, Análisis del mecanismo de oxidación de paracetamol con reactivo foto-feton, *Universidad del País Vasco*.
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:5T6RkAe8MM8J:www.aguasresiduales.info/descargar/revista/articulos/ehvJA7g4DlkxgqEfr5pF6c9fg.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx>
- [24] J.P. Telo, J.S.C. Viera, Mechanism of free radical oxidation of caffeine in aqueous solution, *Journal of the Chemical Society*, 2(1997) 1755-1757.

- [25] M. Ravi-Kumar, M. Adinrayana, Oxidation of caffeine by phosphate radical anion in aqueous solution under anorexic conditions, Indian Academy. Science, 112(2000), 551-557.
- [26] S.Collado-Alonso, Oxidación húmeda de compuestos cianurados y fenólicos, Universidad de Oviedo, España, 2010.
- [27] A. Korolkovas, J.H. Burckhater, Compendio esencial de química farmacéutica, Reverté, España, 1983.
- [28] K. A. Connors, G.L Amidon, V.J. Stella, Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, Jhon Wiley & Sons, Canadá, 1986.
- [29] E.Kalatzis, Reactions of acetaminophen in pharmaceutical dosage forms: Its proposed acetylation by acetylsalicylic acid, Journal of Pharmaceutical Sciences, 9(1970), 193-196.