

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

Jhonnell 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 cromatográfica 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).

^a Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú. jhonnell28@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 Technologies 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 disminuye 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 30°C; 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 0,45 μ m. 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 0,45 μ m. 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 \pm 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.³

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

$$\% R = \frac{X_H - X}{X_A} \cdot 100 \quad \text{Donde:} \quad \begin{array}{l} X_H = \text{Cantidad de analito hallado} \\ X_A = \text{Cantidad del analito añadido} \end{array}$$

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

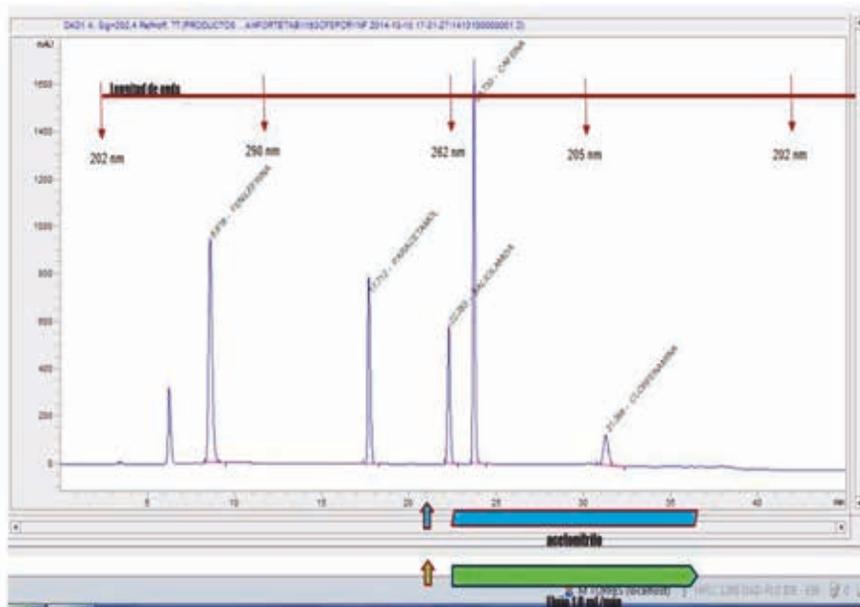


Figura 1. Cromatograma del estándar de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato

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 ($r^2 \geq 0,98$). 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(4.667)}	33196,157	14250,573	19515,508	85997,996	59875,273
IC-Pendiente	182,198	119,376	139,698	293,254	244,694
T _{exp(2.16)} > T _{tabla}					
IC-Intercepto	1,939	0,50	0,656	0,508	2,004
T _{exp} < T _{tabla(2.16)}					
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(5.591)}	338453,861	330625,4	7794,823	161170,648	7605,869
IC-Pendiente	581,768	575,000	88,288	401,461	87,212
T _{exp} > T _{tabla(2.365)}					
IC-Intercepto	0,843	0,769	2,303	0,128	0,453
T _{exp} < T _{tabla(2.365)}					
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) $\leq 2,0$ %. (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) $\leq 2\%$

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 cromatográfica 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 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 ($r^2 \geq 0,98$). 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 líquida 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 simultánea 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.