

Determinación de maleato de clorfeniramina por cromatografía líquida de alta resolución y paracetamol por espectrofotometría ultravioleta en tabletas de Kogrip®.

Delia Elena Garbey-Lavielle, Isabel Colome-Valdés*, Ofelia Fariñas-Suarez*, Ana Margarita-Esteves Guas*

Departamento de Investigaciones Química, Empresa Laboratorios Medsol, UEB Solmed. Avenida 25 esquina 262, Ciudad de la Habana. Cuba. *Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Cuba. elenag@ms.medsol.cu

Recibido: 25 de agosto de 2015.

Aceptado: 27 de noviembre del 2015.

Palabras clave: Kogrip, cromatografía líquida de alta resolución, espectrofotometría UV-VIS, validación.

Key words: Kogrip, high resolution liquid chromatography, UV VIS spectrophotometry, validated.

RESUMEN. El kogrip® es una formulación farmacéutica en tabletas que contiene 325 mg de paracetamol y 2 mg de maleato de clorfeniramina. Dos métodos analíticos se desarrollaron para el control de calidad de esta formulación. El maleato de clorfeniramina se determinó mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución. Se aplicó un diseño de experimentos multifactorial ²³ para la selección de la fase móvil. Las condiciones óptimas encontradas fueron: Columna LiChrosorb-100 Diol, 10 µm Flujo: 1,2 mL/min.; longitud de onda: 262 nm; fase móvil: disolución buffer de fosfato pH 6,22 –acetonitrilo –isopropanol. El contenido de paracetamol se determinó mediante un método espectrofotométrico. Se evaluaron diferentes disolventes y se seleccionó el agua, como el más adecuado y la lectura de la absorbancia a 243 nm. Ambos métodos fueron validados y cumplieron con los parámetros de linealidad, especificidad, exactitud y precisión.

ABSTRACT. Kogrip is a pharmaceutical tablet formulation containing 325 mg of paracetamol and 2 mg chlorpheniramine maleate. Two analytical methods were developed for the quality control of this formulation. chlorpheniramine was determined by a high performance liquid chromatography method. A Multifactorial experiment design ²³ was applied to select the mobile phase. The optimal conditions were: LiChrosorb-100 Diol column, 10 µm, Flow: 1.2 mL/ min; wavelength: 262 nm; mobile phase: phosphate buffer solution pH 6.22 -isopropanol acetonitrile. Paracetamol content was determined by a spectrophotometric method. Various solvents were evaluated and water was selected as the most appropriate for reading the absorbance at 243 nm. Both methods were validated and fulfilled the parameters of linearity, specificity, accuracy and precision.

INTRODUCCIÓN

Kogrip es la marca comercial de una formulación farmacéutica que contiene paracetamol 325 mg (PA) y maleato de clorfeniramina 2 mg (MC) como ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) y se presenta en forma de tabletas. Posee una acción analgésica - antipirética y antihistamínica.¹ Está indicada para la prevención y el tratamiento de estados gripales y de rinitis. Existen diferentes formas farmacéuticas con combinaciones donde se encuentran presentes estos IFAs; en la literatura se describen métodos para su determinación, predominando la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), entre ellos se encuentran los reportados por Wu,² Qi ML,³ Marin A⁴ y la farmacopea USP 30 en una monografía de una formulación de tabletas que contiene cuatro IFAs, el PA, se analiza con una columna L7 (rellenos con grupos octilsilano) y como fase móvil: agua, metanol y ácido acético glacial y el MC se determina con

una columna L11 (rellenos de grupos fenilo) y como fase móvil (FM) metanol, agua, fosfato monobásico de potasio, clorhidrato de trietilamina, lauril sulfato de sodio y ácido fosfórico.⁵

El Kogrip no se encuentra registrado en las farmacopeas internacionales, por lo que se impone la necesidad de desarrollo de los métodos analíticos para la valoración química en el control de calidad.⁶ En esta formulación el MC se encuentra como micromponente, mientras que el PA está como macrocomponente, de aquí que se propongan dos métodos para sus determinaciones. Para el primero, se plantea el método de CLAR⁷ y para el PA la espectrofotometría UV-VIS. El desarrollo de una técnica analítica exige el estudio de validación, con el fin de cumplimentar las regulaciones de las Buenas Prácticas de Fabricación de medicamentos (BPF), de ahí que a ambos métodos utilizados en la determinación de estos IFAs se les realiza un estudio de validación.⁸⁻¹⁰

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 3 lotes de la formulación Kogrip elaborados en los Laboratorios Solmed La Habana, Cuba. Los ingredientes farmacéuticos no activos (exipientes) utilizados son los correspondientes a las tabletas de Kogrip, compuestos por: Celulosa Microcristalina, Polivinil Pirrolidona, Carboximetil Almidón Sódico, Magnesio Estearato y otros.

Reactivos y disoluciones: MC y PA, estándares de referencia certificado del Centro Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Cuba. MC, PA, ácido maleico, materia prima calidad farmacéutica. Disolución de (MA) 6,0 y 0,06 µg/mL. Disolución de PA 1,0 y 10,0 µg/mL. Disolución al 1,0 % de ácido maleico. Disoluciones de 1,0 % y 0,01 µg/mL de 4-aminofenol. Disolución de buffer fosfato de pH 6,22. Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), (99,5 %), trietilamina, (98 %), acetonitrilo (CH₃CN), (Chromasolv, 99,8 %), metanol (CH₃OH). (Chromasolv, 99,8 %), 2- propanol (99 %) todos p.a y de procedencia Riedel-de Haën Alemania. Papel de filtro de cuantificación rápida. Agua bidestilada, (Bidestilador GFL-2104, Alemania). Filtro de jeringuillas 0,45 µm. Cristalería de laboratorio certificada.

Equipos y accesorios: Cromatógrafo líquido KNAÜER (Bomba Smartline K-1000, detector Smartline 2600 (Con arreglo de diodos), inyector RHEOYNE 7725i, Loop 20 µL, (Alemania). Zaranda Horizontal HS 501 D IKA, (Alemania). pHmetro Radiometer PHM-82, (Francia). Espectrofotómetro Jasco V-530 con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, (España). Columnas KNAÜER, *Lichrosorb* CN 10 µm 100A (150 x 4,6); (250 x 4,6) mm y *LiChrosorb* Diol 10 µm 100A, (250 x 4,6) mm, (Alemania).

Método Cromatográfico: Se utilizó una columna Lichrosorb-100 Diol, 10 µm de (250 x 4,6) mm DI, con flujo de 1,2 mL/min. y el loop de 20 µL. La FM se preparó con disolución de buffer de fosfato de pH 6,22 –acetonitrilo – isopropanol. Patrón y muestra se prepararon a concentración de 6,0 µg/mL y disueltas en FM. Se determinó a longitud de onda de 262 nm.

Espectrofotométrico: A partir de un procesamiento único de la muestra, del filtrado con concentración de MC 6,0 µg/mL se preparó una disolución de concentración 10,0 µg/mL de PA, se utilizó cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y se midió la absorbancia a 243 nm. Se utilizaron los programas de cómputo Microsoft EXCEL, STATGRAPH PLUS versión 5,1, EUROCHROM 2000 y ChromGate 3,1.

Validación: Para el ensayo de especificidad se registraron los cromatogramas del placebo cargado con el analito a concentraciones de 25, 50, 75,100 y 125 % y fueron comparados los factores de respuesta de las regresiones lineales con y sin placebo; se identificaron en los cromatogramas los valores de tiempo de retención (tr) de cada analito y de los productos de degradación, ácido maleico y 4-aminofenol (1%). En el PA se evaluó la absorción en el ultravioleta del MC y el 4-aminofenol. Para la linealidad se determinó el ajuste al modelo lineal, la prueba de linealidad y proporcionalidad. En la exactitud del método se ensayaron tres niveles de concentraciones (80,100 y 120) %. Para el parámetro de precisión se realizaron los estudios, a dos niveles de concentración por sextuplicado y precisión intermedia con la participación de tres analistas en tres días a un nivel de concentración por sextuplicado.⁶

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo del método de cromatografía para la cuantificación de MC

Selección de la composición de la FM, la longitud de onda y columna de trabajo

Se realizó un diseño de experimentos 2³ con el fin de establecer las proporciones adecuadas de los disolventes en estudio (Tabla 1). Se analizaron los siguientes parámetros: números de platos teóricos (N), tr, resolución (R) y asimetría (T), teniendo como límites que R debe ser mayor de 2; T debe ser menor de 2; N mayor de 1000 y tr inferior a 10 min. El experimento 6 (Tabla 2) tiene tr menores de 10 min., R mayor de 2 entre el PA y la Clorfeniramina. Con esta proporción de disolventes se realiza la comparación en dos columnas. La primera, Lichrosorb CN 100, (250 x

4,6) mm DI, 10 μ m y la segunda una Lichrosorb Diol 100, (250 x 4,6) mm DI, 10 μ m. Ambas columnas presentan buenos resultados pero la columna LiChrosorb-100 Diol muestra mayor número de platos teóricos.

Tabla 1. Diseño de experimento, para las diferentes relaciones de disolventes: A- buffer: máx. 30 mL-min. 10 mL, B- acetónitrilo: máx. 35 mL- min. 10 mL, C- isopropanol: máx. 35 mL- min. 10 mL

No Experimento	A, mL	B, mL	C, mL	Aleatoriedad
1	10	30	10	2
2	10	30	35	5
3	35	10	35	8
4	35	30	10	4
5	35	30	35	7
6	10	10	35	3
7	10	10	10	1
8	35	10	10	6

Columna utilizada: KNAÜER CN, *Lichrosorb* 100, (150 x 4,6) mm, 10 μ m.

Tabla 2. Comparación de columnas y longitudes con las condiciones de FM del experimento 6

Columna	262 nm				220 nm			
	tr	R	N	T	R	N	T	
LiChrosorb-100 CN, 10 µm (250 x 4,6) mm	5,3	8,7	2949	1,2	3,3	102	3,3	
LiChrosorb-100 Diol, 10 µm (250 x 4,6) mm	4,6	7,8	3236	1,2	4,1	3030	3,4	

Los tiempos de retención del ácido maleico y del PA fueron de 0,9 y 2,3 min. con la columna CN y con la columna Diol fueron de 1,8 y 2,4 respectivamente. Los resultados mostrados confirman que el máximo de absorción a 262 nm es donde se obtienen los mejores resultados. (Tabla 2)

Sistema cromatográfico propuesto: Columna: Lichrosorb-100 Diol, 10 μ m (250x 4.6) mm. Flujo: 1,2 mL/min. Longitud de onda: 262 nm. Loop: 20 μ L. FM buffer fosfato pH 6,22-acetonitrilo-isopropanol (10:10:35). Concentración Inyectada de MC 6,0 μ g/mL, y PA 1 mg/mL.

Estudio de especificidad en la determinación cromatográfica

Influencia del Placebo. La matriz en estudio está compuesta por los analitos y el placebo. A partir de la disolución patrón de MC 300,0 μ g/mL, se prepararon diferentes disoluciones de trabajo en el rango de 50 a 150 %.

De los resultados de este estudio con y sin placebo y su comparación estadística se observa que no existen diferencias significativas entre las variabilidades de las dos poblaciones (estadígrafo F), ni entre sus medias (estadígrafo T) (p-

valores superiores a 0,05), (Tabla 3) así como se tiene la certeza de que la presencia del placebo, no influyó al no existir componentes cuyos picos afecten la determinación de la clorfeniramina, o sea que dichos componentes no tuvieron efecto matriz que influyan en los resultados de la correcta cuantificación del analito en estudio.

Tabla 3. Factores de respuestas(pendientes) de las regresiones lineales

($\mu\text{g} / \text{mL} \times 10^4$)	Sin Placebo	Con Placebo
Promedio	1,12 %	1,12 %
Desviación estándar	0,013	0,007
CV	1,19 %	0,64 %
Resultados estadísticos. $F = 0,674$ $p\text{-valor} = 0,462$ $T = -2,011$ $p\text{-valor} = 0,053$		

Influencia de los productos de degradación. El Ácido Maleico existe como producto de la síntesis del MC y el 4-aminofenol como producto de degradación para el PA. Se evaluó la interferencia de las especies en la determinación de la clorfeniramina; se prepararon muestras que contenían el 1,0% de 4-aminofenol (Fig. 5) y ácido maleico (Fig. 6).

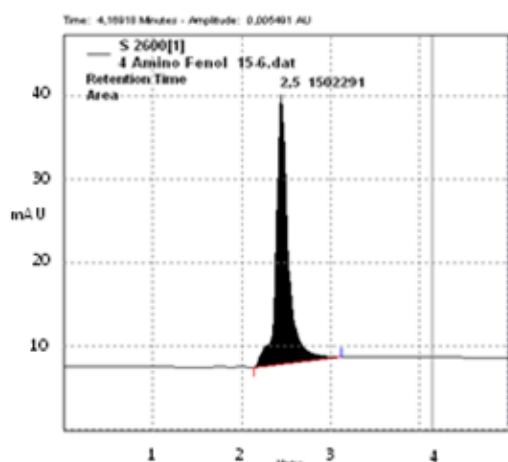


Fig. 5. Cromatograma de 4-aminofenol

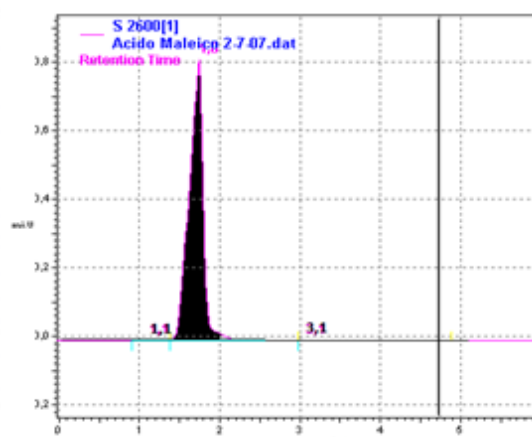


Fig. 6. Cromatograma del ácido maleico

Los tr de estos analitos son diferentes al de la clorfeniramina (4,6 min.), 4-aminofenol, (2,5 min.) y el ácido maleico (1,1 min.).

El cromatograma de una muestra real, donde están presentes todas las posibles interferencias, (Fig. 7), se aprecia que todos mantienen tr diferentes al de la clorfeniramina. El ácido maleico eluyó a 1,9 min., el PA se obtuvo a 2,5 min., mientras que la Clorfeniramina se mantuvo a 4,6 min. Por lo que existió buena resolución y no existieron interferencias con los compuestos de la matriz y el analito de interés. Se comprobó la pureza de las señales por DAD Resultados que demostraron que el método es específico.

Desarrollo del método espectrofotométrico para la evaluación cuantitativa de paracetamol

A partir de una disolución patrón de PA de 1 mg/mL se preparó una disolución de 10,0 $\mu\text{g/mL}$, en tres disolventes (agua, acetonitrilo y metanol). Se obtuvo el espectro de cada una de estas disoluciones desde 200 a 400 nm. Se seleccionó el agua, y se realizó la medición de la absorbancia del PA a 243 nm.

Estudio de especificidad para la determinación espectrofotométrica. Influencia del MC en la determinación

Se prepararon disoluciones patrones de MC de concentración 0,06 $\mu\text{g/mL}$, 4-aminofenol 0,01 $\mu\text{g/mL}$ y de PA de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ disueltas primeramente en FM y posteriormente se llevó a volumen con agua. Se registró el espectro UV de cada analito, para la evaluación de la interferencia del MC en la determinación (Fig. 8). La absorción del MC a 243 nm fue prácticamente nula, por lo que no influyó en la cuantificación del PA, al igual que el 4-amino fenol 0,01 $\mu\text{g/mL}$. (Fig. 9).

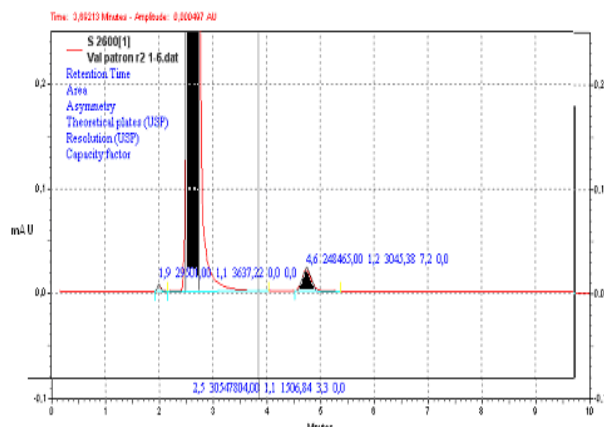


Fig. 7. Cromatograma de una muestra real.

Estudios de validación

A partir de los resultados (Tabla 4) se observó para la validación del método cromatográfico y espectrofotométrico (Tabla 5), que en las pruebas de linealidad de ambos métodos los coeficientes de correlación fueron superiores a 99,0 %. Los valores de factores de respuesta fueron inferiores al 5 %, lo que evidenció fuertes relaciones entre las variables dependientes concentración y las independientes áreas del pico y absorbancia respectivamente para cada método.

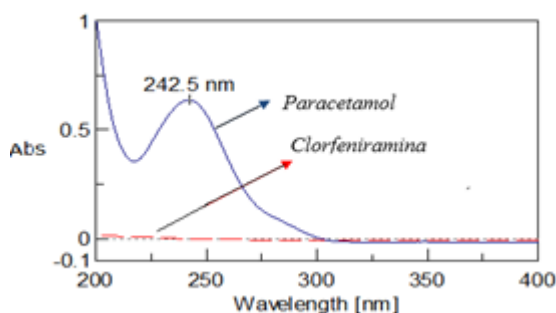


Fig. 8. Espectros de PA 10 µg/mL y maleato de Clorfeniramina 0,06 µg/mL.

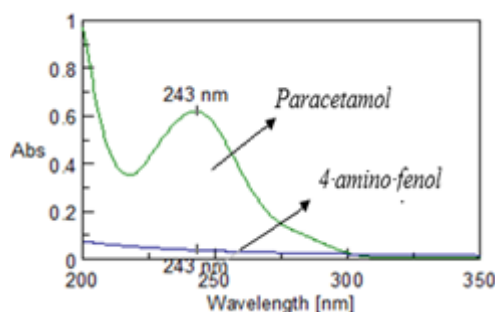


Fig. 9. Espectros UV-VIS del PA concentración de 10 µg/mL y del 4-aminofenol de 0,01 µg/mL.

En el rango de concentraciones estudiados en la exactitud, los valores de porcentaje de recobrados estuvieron dentro de los límites establecidos para clorfeniramina (98-102 %), y para el PA (97-103 %), con CV menores de 2 % para ambos analitos. En los estudios intraensayo se obtuvo en el ensayo de Fischer valores de p superiores de a 0,05 lo que demuestra la buena repetibilidad de los métodos. Los valores que se obtienen de las pruebas de Contraste de Cochran para los estudios de la precisión intermedia demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas, ni las precisiones alcanzadas en los diferentes días, teniendo valores de p igual a 0,92 para la técnica cromatográfica y de 0,4 para la técnica espectrofotométrica. Los resultados obtenidos en los parámetros de validación permiten la disponibilidad de los métodos analíticos para el control de calidad de los IFAs en las tabletas de Kogrip.

Tabla 4. Resultados de la validación del método cromatográfico

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad	Ajuste al modelo lineal: Coeficiente de correlación $R > 0,99$; coeficiente de determinación $R^2 > 0,98$ pendiente diferente de cero p-valor $< 0,05$ Prueba de linealidad: Factores de respuesta semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente con coeficiente de variación (CV) $< 5,0 \%$ Prueba de proporcionalidad: Intercepto no diferente de cero; p-valor $> 0,05$	$R = 0,9992$; $R^2 = 0,9984$; Pendiente: 1,08 y p-valor = 0,000 0 CV = 1,6 % Intercepto = 0,0 p-valor = 0,07
Exactitud	Mínimo nueve determinaciones a tres niveles de concentración. % de recobrado entre 99,0 y 101,0 %. CV $\leq 2,0 \%$. Contraste C de Cochran: p-valor $= \geq 0,05$	n = 9. 3 niveles de concentración. Recobrado promedio: 100,2 %, CV = 0,5 %. C de Cochran: p-valor = 0,31
Precisión	dos niveles de concentración por sextuplicado. CV $\leq 2,0 \%$. Test de Fischer p valor $\geq 0,05$	80 % CV = 1,3, 120 % CV = 0,7 p valor = 0,57
Precisión Intermedia	Tres analistas, tres días. 1 nivel de concentración por sextuplicado CV $\leq 2,0 \%$. Test de C de Cochran p valor $\geq 0,05$.	Día 1 CV = 1,4 %, día 2 CV = 1,4 %, día 3 CV = 1,1%. C. de Cochran p= 0,92

Tabla 5. Resultados del proceso de validación de la técnica espectrofotométrica

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad	Ajuste al modelo lineal Coeficiente de correlación $R > 0,99$. Coeficiente de determinación $R^2 > 0,98$. Pendiente diferente de cero p-valor $\leq 0,05$. Prueba de linealidad: Factores de respuesta semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente con coeficiente de variación (CV) $< 5,0 \%$. Prueba de proporcionalidad: Intercepto no diferente de cero, p-valor $\geq 0,05$.	$R = 0,999$; $R^2 = 0,99$; Pendiente: 65,0 p-valor = 0,000 0 CV = 0,5 % Intercepto = 0,002 p-valor = 0,052
Exactitud	Mínimo nueve determinaciones a tres niveles de concentración. % de recobrado entre 97,0 y 103,0 %. Coeficiente de variación (CV) $\leq 3,0 \%$.	n=9. 3 niveles. X media recobrado = 101,3 %, CV = 0,7 %
Precisión	Dos niveles de concentración por sextuplicado. CV $\leq 3,0 \%$. Test de Fischer p valor $\geq 0,05$	80 % CV = 2,3 % 120 % CV = 1,7 % p valor = 0,8
Precisión Intermedia	3 Analistas, 3 días. 1 nivel de concentración por sextuplicado. Coeficiente de variación $\leq 3,0 \%$. Test de C de Cochran p valor $\geq 0,05$	Día 1 CV = 1,9 % día 2 CV = 2,0 % día 3 CV = 0,2 % C de Cochran p = 0,4

CONCLUSIONES

La técnica desarrollada por cromatografía líquida de alta resolución y el método espectrofotométrico para la cuantificación de MC y PA en tabletas de Kogrip mostraron ser precisos, exactos, lineales y proporcionales en los

intervalos estudiados y selectivos en la separación de los IFAs de sus posibles productos de degradación y los excipientes en la formulación.

Los métodos son válidos para los estudios de control de calidad, y estabilidad de tabletas de Kogrip®.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diego L. Estudio de estabilidad de las tabletas de kogrip®. SINTEFARMA 2002;8(2): julio-diciembre.
2. Wu, Investigation on liquid chromatographic separation of basic compounds using silica column with aqueous/organic mobile phase containing triethylamine and acetic acid. Biomed-Chromatogr, Sep 2004; 18(7): 43-449.
3. QiML. LC method for the determination of multiple components in a compound cold formulation. Chromatographia, Jul 2004; 60(1-2): 105-108.
4. Marin AC, CE versus HPLC for the dissolution test in a pharmaceutical formulation containing acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine. J-Pharm-Biomed-Anal, 29 Jun 2004; 35(4): 769-777.
5. Farmacopea de los Estados Unidos. USP 30- NF 25: 1283.
6. Centro para el Control Estatal de los medicamentos, Cuba. Validación de métodos analíticos. Regulación no. 41-2007.
7. Dierksmeier G. Métodos cromatográficos. Editorial científica técnica, la Habana, Cuba 2005; 4: 210-225.
8. Castillo B, Aguilar. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Revista Cubana de Farmacia, 1996;30:(1) enero-abril.
9. FDA "International Conference on Harmonisation; Draft Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Methodology; Availability; Notice", 1996.
10. British Pharmacopoeia CD 2003. Versión 7.0 The stationery Office Ltd. Vol. I: 1064.