

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

DETERMINACIÓN DE ATROPINA SULFATO Y DIFENOXILATO CLORHIDRATO EN REASEC TABLETAS. VALIDACIÓN

Marlene Porto Verdecia,¹ Belkis de la Paz Ferreiro² y Nuria García Díaz²

RESUMEN

El reasec es un antidiarreico cuyo efecto viene dado por la asociación de 2 principios activos, atropina sulfato y difenoxilato clorhidrato. La unión de ambos trae como resultado la inhibición del peristaltismo del tracto gastrointestinal que puede ser posible tanto a nivel central como local. De la literatura revisada para el caso del difenoxilato clorhidrato se escogió el método por cromatografía líquida de alta eficiencia por aprovechar la posibilidad de que se trataba del método propuesto en el registro de medicamentos para el estudio de estabilidad en la formulación de este principio activo. El método para la determinación de atropina sulfato se encuentra reportado en la USP 23 y el criterio de selección fue uno de los menos complejos en la cuantificación de esta. Teniendo en cuenta las regulaciones establecidas que aseguran el cumplimiento de las buenas prácticas de producción, el presente trabajo se propone la validación prospectiva de los métodos para la cuantificación de los principios activos componentes del reasec, por lo que se realizaron los estudios de especificidad, exactitud, precisión, linealidad y rango. En ambos casos se cumplieron con los requisitos establecidos a los métodos analíticos que se encuentran dentro de la categoría I por ser empleados para la cuantificación de los componentes activos de la formulación. Los resultados obtenidos demostraron que ambos métodos analíticos son fiables por permitir la cuantificación de los 2 principios activos y cumplir además, con los requisitos establecidos para los parámetros evaluados dentro de la categoría a la que pertenecen cada uno.

DeCS: DIFENOXILATO/análisis; ATROPINA/analysis; ANTIDIARREICOS/uso terapéutico; CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION; CROMATOGRAFIA DE GASES; QUIMICA FARMACEUTICA; TECNOLOGIA FARMACEUTICA.

El reasec es un antidiarreico cuyo efecto viene dado por la asociación de 2 principios activos, la atropina sulfato y el difenoxilato clorhidrato, los cuales actúan inhibiendo el peristaltismo del tracto gastro-

intestinal tanto a nivel central como local¹ (Expediente de Registro de reasec tabletas.)

El objetivo de este trabajo está encaminado a la validación prospectiva de los métodos de análisis para la cuantificación

¹ **Master en Ciencias.**

² **Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.**

de atropina sulfato y difenoxilato clorhidrato en reasec tabletas mediante métodos de cromatografía gaseosa (CG) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) respectivamente. Según la clasificación de la USP 23, ambos casos se encuentran dentro de la categoría 1 por ser empleados en la cuantificación de los principios activos constituyentes de la formulación.^{1,2,3}

Para cumplir con los objetivos propuestos se evaluaron los parámetros de desempeño en cada uno de los métodos de análisis, por lo que se realizaron estudios de especificidad, linealidad, exactitud y precisión en ambos casos^{3,4} (Regulación N.4: Principios generales para la validación de procesos en la industria farmacéutica. CEDMED. 1994); (Texto sobre validación de procedimientos analíticos directiva tripartita. Armonizado de ICH. Octubre, 1994); (ISO/Disk 5725-2-1991 Accuracy [trueness and precision of measurement method and result] general principles and definition); (2do Taller de Validación. Validación de métodos analíticos. Impartido por los licenciados Alfredo Fernández [CIDEM] e Ileana Rosales [CIGB]. 1995).

MÉTODOS

Se utilizaron tabletas de reasec y materiales de referencia química elaborados por el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).

El análisis del difenoxilato clorhidrato se realizó con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución KNAUER constituido por bomba KNAUER modelo PUMP 64, detector KNAUER de longitud de onda variable a 254 nm como longitud de onda de trabajo y un inyector Rheodine 7125 al que se le fijó 20 µL como volumen de inyección, a un flujo de 2 mL/min, con fase móvil de *buffer* fosfato pH – 3,1 y

metanol (60:40); la separación se efectuó en una columna Rp –18 de 250 cm X 4 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 10 µ.

El análisis de la atropina sulfato se realizó con un equipo de cromatografía gaseosa VARIAN 6000 con una temperatura en columna de 210 °C, temperaturas en el detector y el inyector de 250 °C, a un flujo de 30 mL/min y nitrógeno como gas portador.

En ambos casos se utilizó un integrador SHIMADSU modelo C-R6A y se realizó la cuantificación por el método del estándar externo en el caso de la CLAE y por el método del estándar interno para la CG.

Las muestras de referencia y ensayo para el difenoxilato se prepararon a una concentración de 0,3 mg/mL, se disolvieron en fase móvil y se filtraron en caso necesario.

Para la CG la preparación de las muestras fue más compleja; se prepararon soluciones patrones de una concentración de 0,125 mg/mL, se usó como disolvente agua destilada, el estándar interno se utilizó a una concentración de 0,1 mg/mL usando el mismo disolvente de la solución patrón; de estas soluciones se toma 2 mL y se disuelven en *buffer* pH-2,8 y se le realizan extracciones con cloroformo saturado en agua y se centrifuga a 1 000 r.p.m.; a la fase acuosa se adiciona hidróxido de sodio (0,1 mol/L), con ajuste pH a $9 \pm 0,3$, se lava con cloroformo saturado en agua centrifugando en cada lavado las porciones de cloroformo, las que se evaporan y reconstituyen con 0,1 mL de este solvente.

Para las muestras se pesó el equivalente a 250 µg de atropina sulfato, se disolvió en *buffer* y se les realizó el mismo tratamiento que al patrón y al estándar interno.

En los ensayos de especificidad para ambos casos se utilizaron soluciones de placebo, soluciones de referencia y

soluciones de ensayo. Para el difenoxilato clorhidrato por tratarse de un método reportado para el estudio de estabilidad se prepararon además soluciones degradadas sometiendo la materia prima a temperatura de 100 °C y la solución de ensayo a hidrólisis por 24 h. La comprobación se realizó por la técnica a validar y se utilizó como método auxiliar la cromatografía en capa delgada.

En los ensayos de linealidad y de exactitud se prepararon las muestras a concentraciones correspondientes al 35, 65, 100, 165 % para el difenoxilato clorhidrato, y para la atropina sulfato se trabajó con concentraciones de 40, 60, 100, 160 %, realizándose como mínimo 3 réplicas de cada punto y simultáneamente el estudio de rango para ambos casos.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó por el programa gráfico ordenador MICROCAL ORIGIN 3.1, calculándose el coeficiente de correlación y aplicando la prueba de la linealidad y de la proporcionalidad, además se aplicaron la décima de la normalidad y la de Corchan. En todos los casos se compararon los resultados con los criterios establecidos.

Para el ensayo de precisión se realizaron los estudios de repetibilidad y de reproducibilidad trabajando a partir de una homogénea común y haciéndose el análisis como mínimo por triplicado; en el caso de la repetibilidad se trabajó sobre la base de 6 determinaciones y en el estudio de reproducibilidad las valoraciones se realizaron por 2 analistas.

A los datos obtenidos se le aplicaron la prueba t de Student y la de Fisher, con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre las medias obtenidas y entre las precisiones alcanzadas por los analistas respectivamente, y se compararon los valores experimentales con los calculados para un límite de confianza del 95 % de la media.

RESULTADOS

Los espectros ultravioletas obtenidos del estudio de especificidad para el difenoxilato clorhidrato y la atropina sulfato se muestran en las figuras 1 y 2 respectivamente.

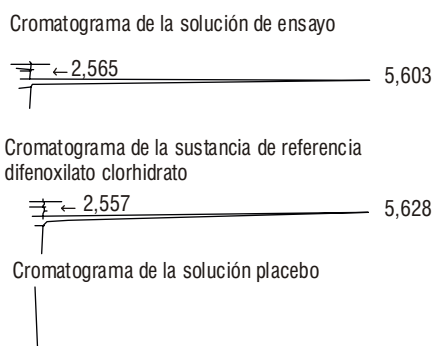


FIG. 1. Cromatogramas del estudio de especificidad del difenoxilato clorhidrato.

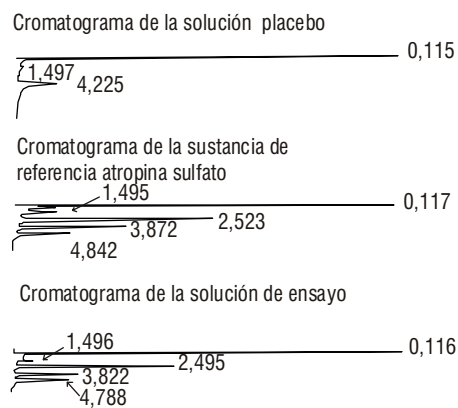


FIG. 2. Cromatogramas del estudio de especificidad de la atropina sulfato.

Los resultados obtenidos en el estudio de linealidad para ambos métodos se expresan en la tabla 1, así como los referentes a la exactitud para cada caso aparecen reportados en la tabla 2.

En el estudio de precisión los estadígrafos evaluados se encuentran reportados en ambos casos en la tabla 3.

TABLA 1. Resultados de los estudios de linealidad

	CLAE	CG
Ecuación de la recta	$y = 1,819 \times 10^6 x - 3181,305$	$y = 0,00117x + 0,00588$
Coefficiente de correlación	$r = 0,9992$	$r = 0,99989$
Desviación estándar de los factores respuestas	$S_r = 20559,67$	$S_r = 0,00001215$
Media de los factores respuestas	$f = 1870079,93$	$f = 0,00117$
Coefficiente de variación	$CV = 1,10\%$	$CV = 0,000103$
Desviación estándar de la pendiente	$S_b = 0,378\%$	$S_b = 0,468$
Desviación estándar del intercepto	$S_a = 2251,073$	$S_a = 0,00345$
Límite de confianza del término independiente	$-3181,305 \pm 4074,441$	$0,00588 \pm 0,00621$

TABLA 2. Resultados de la exactitud

	Criterios %	CLAE	CG
R (%)	98 – 102	100,124	99,193
CV (%)	< 2	0,680	0,903

TABLA 3. Resultados del estudio de precisión

C (x)	Estadígrafo evaluado	Estadígrafo tabulado	CV (%)
CLAE	$F_{cal} = 1,56$ $t_{cal} = 0,011$	$F_{cal} = 7,15$ $t_{cal} = 1,81$	0,57
CG	$F_{cal} = 1,56$ $t_{cal} = 1,32$	$F_{cal} = 7,15$ $t_{cal} = 1,81$	1,02

DISCUSIÓN

El ensayo de especificidad para el difenoxilato clorhidrato demuestra que el método es capaz de detectar y cuantificar el principio activo, incluso en casos en los que ocurriera la degradación de este. Cuando la materia prima se somete a hidrólisis en el cromatograma aparece un segundo pico correspondiente al producto de degradación, que se aisló por cromatografía en capa delgada y posteriormente se analizó por el método en estudio, lo cual demostró que no tiene interferencia con el pico de interés (fig. 1).

La especificidad para la atropina sulfato demuestra la presencia de 3 picos que corresponden al estándar interno, la atropina sulfato y un componente del *buffer* utilizado para la extracción, lo que puede comprobarse en el cromatograma perteneciente a la solución placebo; en este caso no se utilizan sustancias de degradación porque el método no está reportado para los estudios de estabilidad del principio activo (fig. 2).

Los resultados del estudio de linealidad demuestran para ambos casos que el coeficiente de correlación es mayor que 0,999, lo cual corrobora que existe correspondencia entre las concentraciones utilizadas y las respuestas obtenidas. Los coeficientes de variación de los factores respuestas en los 2 casos cumplen con la condición de ser menores del 5 %, semejantes entre sí y al valor de la pendiente, lo que demuestra que nos encontramos frente a una calibración lineal. La prueba del intercepto y la de la pendiente resultaron no significativas.

En los resultados obtenidos para el estudio de exactitud en ambos casos, los coeficientes de variación son menores del 2 % y los porcentajes de recobrado se encuentran entre el 98 y 102 %; la prueba del intercepto y la de la pendiente resultaron no significativas, lo que demuestra que los 2 métodos son exactos. Simultáneamente a

este estudio se realizó el de rango y quedó establecido el intervalo escogido de trabajo en ambos casos, como aquel en el que se cumplen los requisitos de precisión, linealidad y exactitud.

Los resultados del ensayo de precisión indican que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas ni por las medias obtenidas por ellos, además de calcular el coeficiente de variación que cumple con los criterios establecidos para este tipo de estudio en cada uno de los métodos analíticos.

Los parámetros determinados para cada uno de los casos resultaron ser específicos, lineales y exactos, por lo que se concluye que ambos métodos pueden ser utilizados en el control de calidad del producto terminado; para el difenoxilato clorhidrato el método puede ser utilizado además en estudios de estabilidad de este principio activo, pues no se encontraron interferencias del principio activo con los productos de degradación en el estudio de especificidad.

SUMMARY

Reasec is an antidiarrheal whose effect lies in the association of two active principles: atropine sulphate and diphenoxilate chlorhydrate. Their union results in the inhibition of peristalsism of the gastrointestinal tract that may be possible at both local and central levels. From the reviewed literature on diphenoxilate chlorhydrate, we chose the high-performance liquid chromatography since this was the method suggested in the drug registry for the study of stability in the formulation of this active principle. The method for the determination of atropine sulphate is included in USP 23 and the selection criterium was one of the less complex criteria for the quantification of this substance. Taking the set regulations that assure the compliance with the good manufacturing practices into consideration, the present paper is aimed at the prospective validation of methods for the quantification of Reasec's component active principles; hence, specificity, accuracy, precision, linearity and range studies were performed. The requirements set for the analytical methods included in the category I were complied with because they are used in the quantification of the active principles of the formulation. The achieved results showed that both analytical methods are reliable since they allow the quantification of the two active principles and fulfill the requirements established for the evaluation parameters within the category which each of them belongs to.

Subject headings: DIPHENOXILATE/analysis; ANTIDIARRHEALS/therapeutic use; CHROMATOGRAPHY, HIGH PRESSURE LIQUID; CHROMATOGRAPHY, GAS; CHEMISTRY PHARMACEUTICAL; TECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diccionario de especialidades farmacéuticas (DEF). 41 ed. México, DF: Editorial PLM, SA de CV, 1995:1097.
2. United States Pharmacopeia. National Formulary (USP) 23. United States Pharmacopeia Convention. Washington DC, 1993:460,1558-63,1710-1712.
3. Métodos analíticos. Validación. México DF: Colegio Nacional de Químicos, Farmacéuticos y Biólogos, 1992:1,2,6-8.
4. Murray R. Spiegel. Teorías y problemas de la estadística. 2 ed. La Habana: Editorial Gente Nueva, 1975:344.

Recibido: 22 de enero del 2001. Aprobado: 26 de febrero del 2001.
M.Sc. *Marlene Porto Verdecia*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave. 26 No. 1605 entre Boyeros y Puentes Grandes, municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10600, Cuba.