

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRETORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE SUSTANCIAS DE REFERENCIA SECUNDARIAS BAJO LA CUSTODIA DEL INSTITUTO ESPECIALIZADO DE ANÁLISIS”.

POR

Lic. ROMÁN A. AÑINO B.

C.I.P. 2-133-108

PROFESORA RESPONSABLE: ASTREIDA DUCREUX M. Sc.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2006

87E

18 SEP 2008

**TRABAJO PRESENTADO COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARTA OPTAR
AL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS CON
ESPECIALIZACIÓN EN CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS.**

Abd. de CIDC 47.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2006

16445

DEDICATORIA

A mis padres, **Román Antonio (Q.E.P.D.)** y **Raquel Cecilia**, quienes con todo su esfuerzo y amor me brindaron la más hermosa experiencia de formar parte de una familia y me apoyaron en el logro de esta cuarta meta.

A mis abuelas, **Epifanía** y **Rosa**, que siempre han compartido y disfrutado conmigo mis buenos momentos.

A mis tíos y tías, en especial a **Reina Vicelda** por darme siempre el apoyo, comprensión y la tenacidad por contar con una especialidad en el campo farmacéutico.

A **Alba, Zulkerine** y **Víctor**, por haberme brindado la tenacidad, comprensión y apoyo desinteresado en múltiples ocasiones.

A mis hermanas, **Yeseica Del Carmen** y **Cecibeth Eduviges**, por contar con sus oraciones y la esperanza de culminar este objetivo en mi vida.

A mis sobrinos **Luis Román** y **Joccell Antonio**, como un ejemplo para su formación profesional en su vida.

AGRADECIMIENTO

Gracias sean dadas al Padre, por haberme iluminado en todo momento de mi camino y darme la fuerza para culminar y no desistir.

A mis Profesores de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas, que en todo momento me brindaron sus orientaciones, conocimientos y experiencias, de manera especial a la Dra. Nereyda Moscoso, pilar incansable en el cumplimiento de su visión en bien del campo farmacéutico panameño.

A mi asesora, Astreida Ducreux, quien me brindó disponibilidad, experticias, paciencia, ánimo y confianza en la realización de esta práctica profesional.

Al Instituto Especializado de Análisis, por la oportunidad brindada, y al personal por el apoyo brindado y por compartir sus conocimientos. De una manera muy especial a mi supervisora, Nilka G. de Solís, por compartir sus experticias y guiarme en mi práctica profesional en todo momento.

A los compañeros del grupo de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas, por haber tenido la oportunidad de intercambiar nuestras experticias adquiridas en los diversos campos de trabajo que incursionábamos en bien de la salud de los panameños.

A la Dirección Nacional de Farmacia y Drogas del Ministerio de Salud por brindarme la flexibilidad y oportunidad de contar con nuevos conocimientos en el campo del saber en bien de las actividades regulatoria y de control sanitario de los productos medicamentosos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
PORTADA	i
CERTIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	viii
ÍNDICE DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.	7
A. JUSTIFICACIÓN	8
B. OBJETIVOS GENERALES	8
C. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
D. HIPÓTESIS DE TRABAJO	9
E. CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS DE REFERENCIA EVALUADAS	10
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.	15
A. Tipo de Estudio	16
B. Universo y Muestra	16
1. Universo	16
2. Muestra	16
C. Muestreo	16
D. Materiales de Vidrio	17
E. Solventes y Reactivos	18
F. Equipos Utilizados	20

	PÁGINA
G. Pruebas Realizadas	21
1. Acetaminofén	21
2. Clorhidrato de Piridoxina	34
3. Clorhidrato de Propranolol	39
4. Clorhidrato de Ranitidina	42
5. Clorhidrato de Verapamilo	47
6. Trimetoprim	50
H. Instrumento de Recolección de Datos	53
I. Tabulación y Tratamiento de la Información	53
J. Emisión de Certificado de Análisis	54
CAPÍTULO III. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	55
A. Presentación de los Resultados	56
1. Acetaminofén	56
2. Clorhidrato de Piridoxina	67
3. Clorhidrato de Propranolol	73
4. Clorhidrato de Ranitidina	79
5. Clorhidrato de Verapamilo	84
6. Trimetoprim	92
B. Resumen de los Resultados	99
C. Formato del Certificado de Análisis propuesto al I.E.A.	101
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	
A. CONCLUSIÓN	
B. RECOMENDACIONES	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	TÍTULO	PÁGINA
1	Límites de Impurezas Orgánicas Volátiles.	33
2	Valores de Absorción UV de Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP Evaluada y de la Sustancia de Referencia Evaluada.	59
3	Valores de R_f de Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Evaluada.	60
4	Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Acetaminofén.	61
5	Valores de la Prueba de Contenido de Agua en Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP y Sustancia de Referencia Evaluada.	62
6	Valores de Absorbancia del Ensayo de Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Evaluada.	66
7	Valores del Contenido de Cloruro de Clorhidrato de Piridoxina de la Sustancia de Referencia Secundaria.	70
8	Valores de Absorbancia de Clorhidrato de Piridoxina de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Secundaria.	72
9	Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Clorhidrato de Propranolol.	76
10	Valores de la Rotación Específica de la muestra de Sustancia de Referencia Secundaria de Clorhidrato de Propranolol.	76
11	Datos obtenidos en la valoración de Clorhidrato de Propranolol de las Sustancias de Referencia USP y	

TABLA N°	TÍTULO	PÁGINA
	de la Sustancia de Referencia Secundaria.	78
12	Valores de Absorción UV del Clorhidrato de Ranitidina de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Secundaria.	81
13	Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Clorhidrato de Verapamilo.	88
14	Tiempos de Retención de la Valoración de Clorhidrato de Verapamilo de la preparación de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Secundaria.	91
15	Resultados de la Prueba de Identificación por Espectrofotometría UV de la Sustancia de Referencia USP y Sustancia de Referencia Secundaria de Trimetoprim	96
16	Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Trimetoprim.	97
17	Resumen de los Resultados de las Sustancias de Referencia Secundarias Evaluadas.	100

GRÁFICA N°	TÍTULO	PÁGINA
15	Espectros de Absorción IR de Clorhidrato de Verapamilo (Sustancia de Referencia Secundaria): Lote A.	86
	Lote B.	86
16	Cromatogramas representativos de Clorhidrato de Verapamilo: Sustancia de Referencia USP.	90
	Sustancia de Referencia Secundaria.	90
17	Curva de Titulación No Acuosa de Clorhidrato de Verapamilo de la Sustancia de Referencia Secundaria.	92
18	Espectro de Absorción IR de Cloroformo.	94
19	Espectro de Absorción IR de Trimetoprim (Sustancia de Referencia USP).	94
20	Espectro de Absorción IR de Trimetoprim (Sustancia de Referencia Secundaria).	94
21	Espectro de Absorción UV de Trimetoprim.	95
22	Curva de Titulación (No Acuosa) del Ensayo de Trimetoprim en las dos muestras de la Sustancia de Referencia Secundaria.	98

INTRODUCCIÓN

Las Sustancias de Referencia son muy importantes en el sistema de garantía de calidad ya que constituyen una herramienta práctica, directa y confiable en los dictámenes para garantizar los resultados analíticos de laboratorios de Control de Calidad¹¹.

Las primeras Sustancias Oficiales de Referencia fueron utilizadas para los análisis biológicos en la USP X revisión de 1926^{4,16}. Su número ha aumentado desde entonces en forma considerable y actualmente su uso se ha extendido en forma tal que la mayoría de las monografías oficiales las requieren, ya sea para ensayos de identificación, pureza o determinación cuantitativa⁴.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su reunión de septiembre de 1980, definió las *Sustancias Químicas de Referencia Internacional* (ICRS) como productos de uniformidad reconocida, destinadas para utilizarse en comprobaciones analíticas físicas o químicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las de la sustancia en examen. Las Sustancias Químicas de Referencia poseen un grado de pureza correspondiente al empleo al cual se destinan^{4,8}.

Las ICRS son producidas por la OMS y se suministran primordialmente para su uso en pruebas que se describen en las especificaciones para el control de calidad de medicamentos publicadas en la Farmacopea Internacional¹.

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) define las *Sustancias de Referencia* como sustancias o compuestos químicos, de naturaleza orgánica o inorgánica, de alta pureza, utilizadas en comprobaciones analíticas físicas, químicas o biológicas, en las cuales una o más de sus propiedades o características son comparadas con las del

compuesto en evaluación¹⁶. A través de la Ley 1 del 10 de enero de 2001, en su artículo 29, se reconoce como libro de referencia oficial, en primera instancia, a la Farmacopea de los Estados Unidos; es por ello, que utilizaremos en todo el documento, como término oficial de expresión y de mención: Sustancias de Referencia.

La investigación ha ido renovando, día a día, las metodologías de análisis, a través de una tecnología analítica avanzada que permite realizar pruebas más precisas y con límites cada vez más estrechos. De esta manera, ha sido necesario obtener sustancias que hagan posible la evaluación confiable y exacta de materias primas y productos¹¹.

Por lo anteriormente mencionado, las Sustancias de Referencia son usadas para: (1) ayudar al desarrollo de métodos analíticos apropiados, (2) calibrar sistemas de medición, verificar y adecuar programas de calidad en mediciones y (3) contar con una sustancia que, por su alta pureza, características críticas y disponibilidad, se manejen como Sustancias de Referencia¹¹.

Las Sustancias de Referencia se establecen con la colaboración de laboratorios oficiales y/o privados, quienes realizan estudios simultáneos, apoyándose en un protocolo analítico, previamente establecido, dando como resultado, productos de alta calidad plenamente identificados y valorados. Todas las Sustancias de Referencia que se distribuyen deben acompañarse de su certificado de análisis respectivo⁴.

Existen muchos organismos suministradores de sustancias de referencia a nivel internacional. Entre los principales tenemos: la *Organización Mundial de la Salud*, que tiene el fin de supervisar la preparación de los Materiales de Referencia Internacionales (IRM) o Patrones Internacionales (IS); el *Instituto Nacional para Normas y Tecnología*

(NIST) de los Estados Unidos, el cual prepara Materiales de Referencia Certificados (SRM) y los denominados NIST Traceable Standard Reference Materials (NTRSM); la *Oficina Comunitaria de Referencia*, organismo de la Unión Europea encargada de la preparación de Materiales de Referencia Certificados (BCR); el *Laboratorio de Farmacéuticos al Servicio del Gobierno* (Laboratory of the Government Chemist) de Gran Bretaña y el *Laboratorio Nacional de Ensayos* (Laboratoire National d'Essais) de Francia. Además, existe el *Comité de Patrones de Referencia de la USP*, el cual a través del Laboratorio de Investigación y Prueba de la USP y Laboratorios de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), participa en la realización de pruebas de todas las sustancias de referencia nuevas y los reemplazos de las existentes^{7,13}.

Se cuenta con dos tipos o clases de Sustancias de Referencia, primarias y secundarias. Las Sustancias de Referencia *Primarias* deben contar con su correspondiente certificado de calidad y es definido como: “un compuesto que ha sido designado o es ampliamente aceptado, como poseedor de las mejores cualidades metrológicas, cuyo valor es aceptado sin necesidad de referirlo a otros patrones de la misma magnitud”¹³.

Una Sustancia de Referencia *Secundaria* es aquella cuyos valores de sus magnitudes se asignan mediante un procedimiento de medida definitiva o de referencia, calibrado con un patrón primario¹³. En otras palabras, son materiales en los que los valores de una o más de sus propiedades están certificadas por unos procedimientos técnicamente validados, bien sea que esté acompañado de, o pueda obtenerse, un certificado u otra documentación emitida por un ente certificador⁸.

Actualmente, el costo de las Sustancias de Referencia es muy elevado, especialmente el de las Sustancias de Referencia Primarias, debido a que su contenido debe encontrarse alrededor de $100\% \pm 0.02\%$ ^{3,9}. Por esta razón, en muchos casos, en la Dirección Nacional de Farmacia y Drogas de la República de Panamá se acepta, con la solicitud del Registro Sanitario y para los análisis de Control Posterior de los Productos Farmacéuticos, la entrega de Sustancias de Referencia Secundarias provenientes de la Industria Farmacéutica, sustancias éstas de contenido relativamente menor, pero que debe haber sido previamente corroborado por comparación analítica con una Sustancia de Referencia Primaria. En algunas ocasiones se rechaza la entrega de estas sustancias por la falta del porcentaje de potencia específica marcado en la etiqueta del envase, el cual debe corresponder con el declarado en el Certificado de Análisis. En otros casos se rechaza, por ser entregados con fechas próximas a su fecha de vencimiento, o por el incumplimiento con los requisitos establecidos en el artículo 183 del Decreto Ejecutivo No. 178 del 12 de julio de 2001, en donde se especifica que las sustancias patrones requeridas deben estar identificadas con una etiqueta que contenga la siguiente información: el nombre de la sustancia, según la Denominación Común Internacional, número de lote y fecha de expiración o de re-análisis, potencia o porcentaje de pureza, condiciones de almacenamiento y nombre del producto al que corresponde.

En Panamá, el Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos del Instituto Especializado de Análisis (I.E.A.) es el encargado de la determinación de las características de las Sustancias de Referencia Secundarias comparables con las de las respectivas Sustancias de Referencia Primarias. Esta determinación se realiza en este

Departamento, a través de la aplicación de procedimientos técnicamente validados, en su mayoría presentados en las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos vigente, como se establece en el artículo 29 de la ley No. 1 del 10 de enero de 2001, previo a la utilización de estas Sustancias de Referencia.

La realización obligatoria de esta actividad en las Sustancias de Referencia Secundarias trae como consecuencia, por un lado, una demora en la obtención del Registro Sanitario de los Productos Farmacéuticos y del Control Posterior ya que la industria requeriría, algunas veces, de tiempo y dinero para adquirir Sustancias de Referencia Primarias o Secundarias, y por otro lado, el Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos del Instituto Especializado de Análisis tendría que realizar la determinación de los valores de una o más de las propiedades de la Sustancia de Referencia Secundaria justo antes de su utilización.

Capítulo I

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

A. JUSTIFICACIÓN.

El I.E.A. se encuentra en el proceso de evaluar aquellas Sustancias de Referencia Secundarias que están bajo su custodia para incluirlas en la Base de Datos de patrones del Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos, luego de evaluadas todas sus características. De esta manera no es necesaria la reevaluación de la sustancia de referencia cada vez que se requiera en alguno de los laboratorios de la Institución.

Para la escogencia de las Sustancias de Referencia Secundarias a las que se le realizaría la evaluación en esta Práctica Profesional, se tomaron en cuenta dos criterios: (1) que los envases tuvieran un contenido mayor de un gramo y (2) la utilidad, necesidad e interés que presenta la sustancia de referencia secundaria en los diversos laboratorios del I.E.A. Entre las sustancias de referencia que cumplían con estos criterios están el Mesilato de Bromocriptina, Clortalidona, Clorhidrato de Propanolol y Riboflavina, entre otros.

B. OBJETIVOS GENERALES.

Evaluar las características de sustancias de referencia secundarias existentes en el I.E.A, según la metodología presente en la monografía correspondiente de la Farmacopea de los Estados Unidos XXVIII, con el fin de obtener sustancias revaloradas con porcentajes de potencia específica o contenido dentro de los límites de aceptación.

C. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar las Sustancias de Referencia Secundarias de Riboflavina, Clortalidona, Mesilato de Bromocriptina y Clorhidrato de Propanolol, entre otros, de existencia en el I.E.A., comparándolos con las Sustancias de Referencia Primarias.
2. Evaluar la necesidad de la realización de análisis de otras Sustancias de Referencia en el Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos.
3. Tomar decisiones de aceptación o rechazo de estas Sustancias de Referencia Secundarias proporcionadas por las Industrias para la obtención del Registro Sanitario y/o para los Análisis de Control Posterior de los Productos Farmacéuticos, en base a los resultados obtenidos en las pruebas aplicadas y los criterios de aceptación de cada una de ellas.
4. Actualizar la información de las Sustancias de Referencia Secundarias estudiadas en la Base de Datos que reposa en el laboratorio de Desarrollo y Validación de Métodos del Instituto Especializado de Análisis.

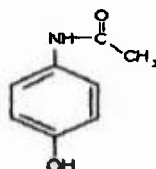
D. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Las características encontradas en las Sustancias de Referencia Secundarias estudiadas son comparables con las de las Sustancias de Referencia Primarias o USP, de manera que pueden ser utilizadas como Sustancias de Referencia en métodos analíticos de rutina en los laboratorios del I.E.A.

E. CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS DE REFERENCIA EVALUADAS.

1. Acetaminofén^{2,6,15,16}:

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: $C_8H_9NO_2$

Peso molecular relativo: 151.16

Nombre químico: Acetamida, N-(4-hidroxifenil)-4'-Hidroxiacetanilida.

Otros nombres: Paracetamol

CAS N°: 103-90-2

Descripción: Polvo cristalino blanco e incoloro.

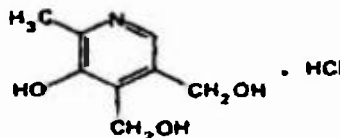
Solubilidad: Muy levemente soluble en agua tibia; considerablemente más soluble en agua caliente. Soluble en metanol, etanol, dimetilformamida, etilendicloro, acetona, etilacetato. Poco soluble en éter. Prácticamente insoluble en petróleo, pentano, benceno.

Categoría Terapéutica: Analgésico, Antipirético.

Conservación: Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz y almacenar a temperatura ambiente controlada.

2. Clorhidrato de Piridoxina^{6,15,16}:

Fórmula estructural.



Fórmula molecular: $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$

Peso molecular relativo: 205,64

Nombre químico: Clorhidrato de 3,4-Piridinadimetanol, 5-hidroxi-6-metilo.

Clorhidrato de Piridoxol.

CAS N°: 58-56-0.

Descripción: Cristales incoloros o polvo blanco, cristalino; inodoro.

Solubilidad: Fácilmente soluble en agua; ligeramente soluble en etanol (~750g/l)

SR; prácticamente insoluble en cloroformo R y en éter R.

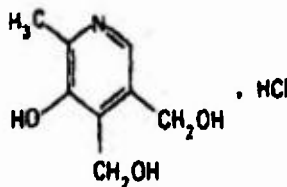
Categoría Terapéutica: Vitamina B₆.

Conservación: Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz.

Información suplementaria: Incluso en ausencia de luz, el Clorhidrato de Piridoxina se descompone gradualmente cuando está expuesto a una atmósfera húmeda; la descomposición es más rápida cuanto mayor es la temperatura.

3. Clorhidrato de Propranolol^{6,15,16}:

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$

Peso molecular relativo: 295.80

Nombre químico: Hidrocloruro de (+) - 2-Propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-(1-naftaleniloxi)

Clorhidrato de (±)-1-(Isopropilamino)-3-(1-naftiloxi)-2-propanol.

CAS N°: 318-98-9.

Descripción: Polvo blanco o casi blanco, cristalino; inodoro.

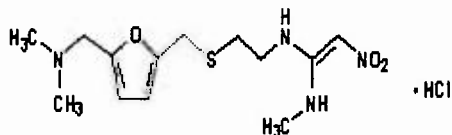
Solubilidad: Soluble en agua y alcohol. Prácticamente insoluble en éter, benceno, etilacetato.

Categoría Terapéutica: Antihipertensivo, Antianginoso, Antiarrítmico (Clase II).

Conservación: Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a 25 °C, con variaciones permitidas entre 15 °C a 30° C.

4. Clorhidrato de Ranitidina^{6,15,16}:

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: $C_{13}H_{22}N_4O_3S \cdot HCl$

Peso molecular relativo: 350.87

Nombre químico: Monohidrocloruro de 1,1- Etenediamina, N-[2-[[[5-

[(dimetilami

no) metil]-2-furanyl]-metil]tio]etil]-N'-metil-2-nitro.

Clorhidrato de N-[2-[[[5-[(Dimetilamino)metil]-2-furanyl]-metil]tio] etil]-N'-metil-2-nitro-1,1-etenediamina.

CAS N°: 66357-59-3

Descripción: Polvo cristalino, de blanco a amarillo pálido.

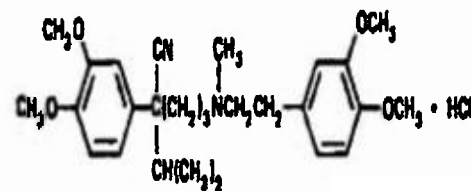
Solubilidad: Librementemente soluble en ácido acético y agua, soluble en metanol, poco soluble en etanol. Prácticamente insoluble en cloroformo.

Categoría Terapéutica: Antiulceroso.

Conservación: Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz.

5. Clorhidrato de Verapamilo^{9,13,15}:

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: C₂₇H₃₈N₂O₄ · HCl

Masa molecular relativa: 491.06

Nombre químico: Benzenoacetnitrilo, Monohidrocloruro de (±) - α-[3[[2-(3,4-dimeto xifenil)etil] metilamino] propil]-3,4-dimetoxi-α-(1-metiletilo).

Monoclorhidrato de (±)-5-[(3,4-dimetoxifenetil)metilamino]-2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilvaleronitrilo.

CAS N°: 152-11-4.

Descripción: Polvo blanco o casi blanco, cristalino; inodoro o casi inodoro.

Solubilidad: Soluble en 20 partes de agua; poco soluble en etanol (~750 g/l) SR; fácilmente soluble en cloroformo R.

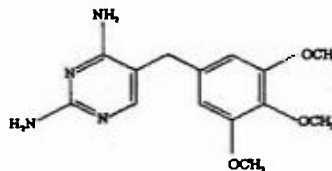
Categoría Terapéutica: Antihipertensivo, Antianginoso, Antiarrítmico (Clase IV).

Conservación: Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz.

Almacenar a 25 °C, con variaciones permitidas entre 15 °C y 30 °C.

6. Trimetoprim^{6,15,16}:

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: C₈H₁₁N₄O₃

Peso molecular relativo: 290.32

Nombre químico: 2,4-Pirimidinadiamino, 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metilo].

2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimetoxibenzil) pirimidina.

CAS N°: 738-70-5

Descripción: Cristales o polvo cristalino de blanco a color crema e inodoro.

Solubilidad: Muy poco soluble en agua; poco soluble en alcohol y acetona; soluble en alcohol bencílico; prácticamente insoluble en tetrahidroclorato carbónico y éter; bastante soluble en cloroformo y metanol.

Categoría: Antibacteriano.

Conservación: Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a 25 °C, con variaciones permitidas entre 15 °C a 30 °C.

Capítulo II

METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

A. Tipo de Estudio.

Este es un estudio exploratorio porque se evalúan las características de algunas de las Sustancias de Referencia Secundarias bajo la custodia del Instituto Especializado de Análisis.

Durante el estudio, se realizan pruebas analíticas a ciertas Sustancias de Referencia Secundarias. En base a los resultados se determinará si cumplen con los Criterios de Aceptación para cada prueba y al final se tomará una decisión en relación a la aceptabilidad de esta Sustancia de Referencia Secundaria.

B. Universo y Muestra.

1. Universo.

El universo para este estudio está representado por todas las Sustancias de Referencia Secundarias que se encuentran bajo la custodia del Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos del Instituto Especializado de Análisis de la Universidad de Panamá, provenientes de la Industria Farmacéutica.

2. Muestra.

La muestra está conformada por aquellas Sustancias de Referencia Secundarias que cumplan con los siguientes criterios: (1) que los envases tengan un contenido mayor de 1 gramo y (2) que la sustancia sea de utilidad, necesidad e interés en los diversos Laboratorios del I.E.A.

C. Muestreo.

Utilizando la Base de Sustancias de Referencia Secundaria con la que cuenta el Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos del Instituto Especializado de

Análisis de la Universidad de Panamá, provenientes de la Industria Farmacéutica, se procedió a evaluar las sustancias citadas en el protocolo de la Práctica Profesional para valorar sus características de identidad y pureza, siempre y cuando cumplieran con los criterios de aceptación previamente establecidos.

Sin embargo, las pruebas aplicadas inicialmente mostraron que en el caso de las Sustancias de Referencia Secundarias de Riboflavina, Clortalidona y Mesilato de Bromocriptina, todos los envases existentes contenían material que ya estaba descompuesto. Por lo que se escogieron otras Sustancias de Referencia no listadas originalmente en el Protocolo.

D. Material de Vidrio.

- Bureta 50 mL Pyrex, U.S.A.
- Cámara de desarrollo para cromatografía de capa fina.
- Capa fina de aluminio cubierta de sílica con fluorescencia 1.0 mm x 6 cm x 10 cm marca Merck.
- Capa fina de vidrio preparada de sílica con fluorescencia 1.25 mm x 6 cm x 10 cm marca Merck.
- Frascos Volumétricos 10 mL, 50 mL Pyrex, México.
- Frascos Volumétricos 100 mL Kimax, U.S.A.
- Frascos Volumétricos 250 mL, 500 mL, Pyrex, U.S.A.
- Frascos Volumétricos ámbar 50 mL, 100 mL Pyrex, U.S.A.
- Matraz Erlenhemeyer 125 mL y 250 mL Kimax, U.S.A.
- Matraz Erlenhemeyer 50 mL Kimax, U.S.A.

- Pipetas Volumétricas 1 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL Kimax, México.
- Pipetas Volumétricas 2 mL, 50 mL Kimax, U.S.A.
- Probetas: 5 mL, 25 mL, 50 mL y 100 mL Pirex, U.S.A.
- Tubo capilar Kimax-51 serie 34507 Kimble Products, U.S.A.
- Tubo de ensayo Kimax, U.S.A.
- Vaso químico 10 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL Kimax, U.S.A.

E. Solventes y Reactivos.

- Aceite Mineral, lote N° 13379. Exp. 3/08/09. Farmacia Arrocha, Panamá.
- Acetato de Mercurio II ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) Art 4410, lote N° 9640565. E. Merck, Darmstadt de Alemania.
- Acetato de Sodio (CH_3COONa), lote N° 142158200. Panreac Química, S.A., E.U.A.
- Acetonitrilo (CH_3CN) AS-1122, lote N° 504066. Tedia Company, Inc. de U.S.A.
- Ácido Acético Glacial ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) AR-0104, lote N° 405145. Tedia Company, Inc. de U.S.A.
- Ácido Clorhídrico (HCl) 37% HR-0870, lote N° 504032. Tedia Company, Inc. de U.S.A.
- Ácido Fosfórico (H_3PO_4) 85 % A 242-1, lote N° 020237. Fisher Chemical, Alemania.
- Ácido Nítrico (HNO_3), lote N° 042474. Ashland Chemical Co. E.U.A.
- Ácido Perclórico (HClO_4) 0.1 mol/L Art. 9065, lote N° 2454614. E. Merck, Darmstadt de Alemania.

- **Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 95-97 %, lote N° 540K1210131. E. Merck, Darmstadt de Alemania.**
- **Cloroformo (CHCl₃) CR-0359, lote N° 403185. Tedia Company, Inc. de U.S.A.**
- **Diclorometano o Cloruro de Metileno (CH₂Cl₂) Art. 6044, lote N° 451K5194944. E. Merck, Darmstadt de Alemania.**
- **Etanol (C₂H₅OH) Código 1.00983, lote N° K20838983 420. E. Merck, Darmstadt de Alemania.**
- **Fenacetina No. 5 WHO (Estándar de Punto de Fusión).**
- **Hexano Sulfonato de Sodio [CH₃(CH₂)₅SO₃ Na], lote N° L36617. J.T. Baker, Inc., U.S.A.**
- **Hidróxido de Amonio, GR (NH₄OH) AX1303-3, lote N° K24651405750. EM Science, Bélgica.**
- **Hydranal[®]- Composite 5 de Riedel-de Haën. Reference N° 34805, lote N° 3301D. Sigma-Aldrich Laborchemikalien Gmbh, Seelze.**
- **Hydranal[®] - Estándar de Agua - 10.0 de Riedel-de Haën. Reference N° 34849, lote N° 40840. Sigma-Aldrich Laborchemikalien Gmbh, Seelze.**
- **Metanol (CH₃OH) MS-1922, lote N° 412115. Tedia Company, Inc. de U.S.A.**
- **Nitrato de Plata Solución Diluido (AgNO₃) 0.1 N, lote N° UN1760. Scharlau Chemie, S.A., Unión Europea.**
- **Piridina (C₅H₅N) Art 7460, lote N° 42477990. E. Merck, Darmstadt de Alemania.**
- **Sal sódica de Dodecilo Sulfato (C₁₂H₂₅NaO₄S), lote N° 537334306. Merck Schuchardt, Alemania.**

- Solución Reguladora (Bifalato) (Código Color Rojo), pH 4, lote N° A10C17. J.T. Baker, México.
- Solución Reguladora (Borato) (Color Azul), pH 10, lote N° A45C15. J.T. Baker, México.
- Solución Reguladora (fosfato) (Código Color Amarillo), pH 7 lote N° A11C17. J.T. Baker, México.
- Sulfapiridina No. 9 WHO (Estándar de Punto de Fusión).

E. Equipos Utilizados.

- Aparato de Fusión Capilar Thomas Hoover.
- Aparato Kart Fisher, Marca Mettler Toledo.
- Balanza Analítica Modelo Mettler AE 163.
- Balanza Modelo Acculab L-Series LA-110.
- Cabina de Fluorescencia Spectroline Model CM-10.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Presión Shimadzu Class VP 5.03.
- Espectrofotómetro IR Perkin Elmer Modelo 1310.
- Espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Modelo Lambda 2S.
- Horno al vacío VWR-1410.
- Horno Program Controller 527 Nabertherm.
- Magne-matic Stirrer Modelo 215 Arthur H. Thomas Co. U.S.A.
- pH metro Modelo 440 Corning.
- Polarímetro Polax-2L Atago.

G. Pruebas Realizadas.

Se realizaron las pruebas de la monografía correspondiente a la sustancia analizada de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXVIII).

Cada prueba se realizó por duplicado a la mayoría de las Sustancias de Referencia Secundarias y se ensayó sólo una muestra de la Sustancia de Referencia Primaria bajo las mismas condiciones.

Se aplican los Criterios de Aceptación establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos XXVIII para la Sustancia de Referencia Secundaria y luego se compararon estas características con las de la Sustancia de Referencia Primaria correspondiente.

1. ACETAMINOFÉN.

a. **Definición de potencia:** El Acetaminofén no debe contener menos de 98.0 % ni más de 101.0 % de $C_8H_9NO_2$, calculado en base anhidra.

b. **Sustancia de Referencia USP <11>:** Acetaminofén ER USP.

c. **Identificación:**

A: Absorción Infrarroja <197 K>:

<197 K> La sustancia analizada se tritura finamente y se dispersa en una pequeña cantidad de bromuro de potasio.

B: Absorción Ultravioleta <197 U>:

Solución: 5 µg por mL.

Medio: ácido clorhídrico 0.1 N en metanol (1 en 100).

<197 U> La Solución Prueba y la Solución Estándar son examinadas espectrofotométricamente, en celdas de 1 cm, en el rango de 200 y 400 nm, a menos que la monografía especifique otra cosa.

Disuelva una porción de la sustancia bajo examen en el medio designado para obtener una solución Prueba con la concentración especificada en la monografía bajo Solución. De forma similar, prepare la solución estándar que contiene el correspondiente patrón de referencia USP.

Registre y compare los espectros concomitantemente obtenidos de la Solución Prueba y la Solución Estándar. Calcule las absorptividades y/o las razones de las absorbancias, cuando este criterio sea incluido en la monografía individual. A menos que se especifique lo contrario, las absorbancias indicadas para estos cálculos son las medidas a la máxima absorbancia. Cuando la absorbancia deba ser medida a una longitud de onda específica diferente a la de máxima absorbancia, las abreviaturas (min) y (sh) son usadas para indicar un mínimo (minimum) y un hombro (shoulder), respectivamente, en un espectro de absorción. Los requisitos se cumplen si el espectro de absorción ultravioleta de la Solución Prueba y la Solución Estándar exhiben máximas y mínimas a las mismas longitudes de onda y las absorptividades y/o razones de absorbancias están dentro de los límites especificados.

C: Responde a la Prueba de Identificación por Cromatografía en Capa Delgada **<201>**: empleando una solución prueba en metanol que contenga

aproximadamente 1 mg por mL y una fase móvil constituida por una mezcla de cloruro de metileno y metanol (4:1).

<201> Trace una línea paralela alrededor de 2 cm del borde de una placa cromatográfica de capa fina, cubierta con una capa de la mezcla de sílica gel cromatográfica de 0.25 mm (Ver Cromatografía <621> en los Capítulos Generales). Aplique 10 μ L de la solución de la Sustancia de Referencia Secundaria y 10 μ L de una solución patrón preparado a partir de la Sustancia de Referencia USP , en el mismo solvente y a la misma concentración que la Solución Prueba, a menos que se señale de otra forma en la monografía individual. Permita que las manchas sequen y desarrolle el cromatograma en un sistema de solventes que consiste de cloroformo, metanol y agua (180:15:1), a menos que se declare de otro modo en la monografía individual, hasta que el frente del solvente se haya desplazado unos $\frac{3}{4}$ de la longitud del plato. Remueva el plato de la cámara de revelado, marque el frente del solvente y permita que éste se evapore. A menos que se declare de otra forma en la monografía individual, localice las manchas en el plato examinado bajo una lámpara de luz ultravioleta. El valor de R_f de la mancha principal obtenida de la Solución Prueba corresponde a la obtenida de la Solución Patrón.

d. Intervalo de fusión <741>:

<741> Prepare la sustancia a probar y llene el capilar de vidrio, con uno de los lados cerrados, con suficiente cantidad del polvo seco para formar una

columna en el fondo del tubo de 2.5 a 3.5 mm de altura, cuando se empaca tan apretado como se pueda, golpeando la punta sobre la superficie del sólido. Caliente el baño hasta que la temperatura esté cerca de 10° por debajo del rango de fusión esperado y se eleve a una tasa de 1 ± 0.5 °C por minuto. Inserte el tubo capilar al termómetro humedeciéndolo con una gota del líquido del baño y ajuste su altura de manera que el material en el capilar esté nivelado con el bulbo del termómetro. Reemplace el termómetro, continúe calentando con agitación constante, de manera que la temperatura se eleve a una tasa de cerca de 3 °C por minuto. Cuando la temperatura esté cerca de 3 °C por debajo del límite inferior del rango de fusión esperado, reduzca el calentamiento de manera que la temperatura aumente la tasa entre 1 °C a 2 °C por minuto. Continúe calentando hasta que la fusión se complete. Registre el rango de fusión tomando en cuenta que la temperatura a la cual la columna de la sustancia colapsa sobre el lado del tubo en cualquier punto se define como el comienzo de la fusión y la temperatura a la cual la sustancia se convierte en líquido se define como el final de la fusión o el punto de fusión. Las dos temperaturas deben caer dentro de los límites del rango de fusión.

e. **Agua, Método I <921>:**

<921> Aparato: Karl Fischer.

Reactivo: Prepare el reactivo Karl Fischer de la siguiente manera: Añada 125 g de yodo para una solución que contenga 670 mL de metanol y 170 mL de piridina.

Pueden ser usadas las soluciones estabilizadoras (Reactivo de Karl Fischer) y los reactivos disponible en el mercado conteniendo solventes u otras bases de piridina o alcoholes diferentes a metanol.

Preparación Prueba: A menos que se especifique en la monografía individual, se usa un peso exacto o cantidad medida de la muestra, según estime la prueba, que contenga de 10 a 250 mg de agua.

Calibración del reactivo: Coloque suficiente metanol u otro solvente apropiado en el envase de titulación cubierto con electrodos y añada suficiente reactivo para dar el color del punto estequiométrico característico o aplicar una corriente de 100 (\pm 50) microamperios continua y un voltaje de 200 mV de potencial.

Procedimiento: A menos que se especifique otra cosa, transfiera 35 a 40 mL de metanol u otro solvente apropiado en el envase para la titulación y titule con el reactivo hasta un punto electrométrico o visual para consumir toda la humedad presente (elimine rápidamente o adicione volumen consumido para que no entre en los cálculos).

Rápidamente adicione la Preparación Prueba, mezcle y titule de nuevo junto con el reactivo. Calcule el contenido de agua, en mg, tomando en cuenta la fórmula: SF en la cual S es el volumen, en mL, del reactivo consumido en la segunda titulación y F es el factor equivalente de agua del reactivo.

f. Residuo por ignición <281>:

<281> Pese con precisión de 1 a 2 g de la sustancia o la cantidad requerida en la monografía específica en un envase apropiado que previamente haya sido incinerado, enfriado y pesado. Caliente, suavemente al principio, hasta que la sustancia esté totalmente carbonizada, fría y entonces, a menos que se establezca en la monografía individual, humedezca el residuo con 1 mL de ácido sulfúrico, caliente suavemente hasta que no se desarrolle humo blanco e incinere a 600 ± 50 °C, a menos que otra temperatura se especifique en la monografía individual, hasta que el carbono sea consumido. Enfríe en un desecador, pese y calcule el porcentaje del residuo. Si la cantidad del residuo obtenido excede el límite especificado en la monografía individual, humedezca nuevamente el residuo con 1 mL de ácido sulfúrico, caliente e incinere como lo hizo anteriormente y calcule nuevamente el porcentaje del residuo. A menos que se indique lo contrario, continúe la ignición hasta obtener un peso constante o hasta que el porcentaje del residuo cumpla con los límites de la monografía específica.

Realice la ignición en un extractor, pero protegido de corrientes de aire y a temperaturas tan bajas como sean posibles para favorecer la combustión completa del carbón. Debe usarse una mufla, si desea, y su uso es recomendado cuando la ignición final debe ser de 600 ± 50 °C.

g. Cloruros <221>: Agitar 1.0 g de Acetaminofén con 25 mL de agua, filtrar y agregar 1 mL de ácido nítrico 2N y 1 mL de nitrato de plata TS.

- <221>** Disuelva, la cantidad especificada de la sustancia bajo estudio, en 30 a 40 mL o en el solvente donde la sustancia se encuentra en solución; agregue agua para hacer un volumen total de 30 a 40 mL y, si es necesario, neutralice la solución con ácido nítrico con papel indicador. Agregue 1 mL tanto de ácido nítrico y de nitrato de plata TS y suficiente agua para hacer 50 mL. Mezcle y permita reposar por 5 minutos protegido de la luz solar directa. A menos que se indique lo contrario en la monografía específica, compare la turbiedad, si es necesario, con la producida por una solución que contiene el volumen de ácido clorhídrico 0.02N especificado en la monografía.
- h. **Sulfatos <221>**: Agitar 1.0 g de Acetaminofén con 25 mL de agua, filtrar y agregar 2 mL de ácido acético 1N y después agregar 2 mL de cloruro de bario SR.
- <221>** Ver Procedimiento en Cloruros de Acetaminofén.
- i. **Sulfuros**: Coloque aproximadamente 2.5 mg de Acetaminofén en un vaso químico de 50 mL. Agregue 5 mL de alcohol y 1 mL de ácido clorhídrico 3N. Humedezca una pieza de papel de prueba de acetato de plomo con agua y fije a la cara inferior de un vidrio reloj. Cubra el vaso químico con el vidrio reloj de forma que parte del papel de acetato de plomo cuelgue cerca de la punta del vaso químico. Caliente el contenido del vaso químico en una placa caliente hasta ebullición.

j. **Metales pesados, Método II <231>:**

<231> Amortiguador de pH 3.5: Disuelva 25 g de acetato de amonio en 25 mL de agua, y agregue 38 mL de ácido clorhídrico 6N. Ajuste, si es necesario, con hidróxido de amonio 6N o ácido clorhídrico 6N hasta pH 3.5; diluya con agua hasta 100 mL y mezcle.

Preparación Estándar: En un tubo de comparación de color de 50 mL, pipeté 2 mL de la solución de plomo estándar (20 ug de Pb) y diluya con agua hasta 25 mL. Ajuste con ácido acético 1N o con hidróxido de amonio 6N hasta pH entre 3 y 4, usando papel indicador de rango angosto como indicador externo. Diluya con agua hasta 40 mL y mezcle.

Preparación Prueba: En un tubo de comparación de color de 50 mL coloque 25 mL de la solución preparada para la prueba como se establece en la monografía individual; disuelva y diluya con agua hasta 25 mL. La cantidad, en g, de la sustancia que se desea analizar, es calculada por la fórmula: $2.0 / 1000L$ en dónde L es el límite de la prueba de metales pesados, en porcentaje. Transfiera la cantidad pesada de la sustancia en un recipiente apropiado, agregue suficiente ácido sulfúrico para humedecer la sustancia y cuidadosamente, incinere a una temperatura baja hasta que se carbonice (el recipiente debe estar levemente tapado durante la ignición). Agregue a la masa carbonizada 2 mL de ácido nítrico y 5 gotas de ácido sulfúrico y caliente cuidadosamente hasta que no se produzca más humo blanco, preferiblemente en una mufla, entre 500° y 600°, hasta que el carbón sea totalmente quemado.

Enfríe, agregue 4 mL de ácido clorhídrico 6N, cubra, digiera en un baño maría hasta que seque. Humedezca el residuo con 1 gota de ácido clorhídrico, agregue 10 mL de agua caliente y digiera por 2 minutos. Agregue hidróxido de amonio 6N, gota a gota, hasta que la solución sea alcalina con papel indicador, diluya con agua hasta 25 mL y ajuste con ácido acético hasta un pH entre 3 y 4, usando un papel indicador de rango angosto como indicador externo. Filtre si es necesario, enjuague el recipiente y el filtro con 10 mL de agua, combine los filtrados y enjuague en un tubo de comparación de color de 50 mL, diluya con agua hasta 40 mL y mezcle.

Procedimiento: A cada uno de los tubos con la Preparación Estándar y con la Preparación Prueba, agregue 2 mL del amortiguador de acetato pH 3.5; entonces adicione 1.2 mL de la base de tioacetamida-glicerina TS, diluya con agua hasta 50 mL, mezcle, permita reposar por 2 minutos y observe contra una superficie blanca.

- k. **p-aminofenol libre:** Transfiera 5.0 g de la sustancia a un frasco volumétrico de 100 mL y disuelva en aproximadamente 75 mL de una mezcla de volúmenes iguales de metanol y agua. Agregue 5.0 mL de solución de nitroferricianuro alcalino (preparada por disolución de 1 g de nitroferricianuro de sodio y 1 g de carbonato de sodio anhidro en 100 mL de agua), diluya a volumen con una mezcla de volúmenes iguales de metanol y agua, mezcle y deje en reposo durante 30 minutos. Determine concomitantemente las absorbancias de esta solución y de una solución recién preparada de p-

aminofenol, preparada de forma similar a una concentración de 2.5 μg por mL, usando las mismas cantidades de los mismos reactivos, en celdas de 1 cm, al máximo de aproximadamente 710 nm, con un espectrofotómetro adecuado, utilizando como blanco 5.0 mL de solución de nitroferrocianuro alcalino diluido a 100 mL con una mezcla de volúmenes iguales de metanol y agua.

1. **Límite de p-cloroacetanilida:** Transfiera 1.0 g de acetaminofén a un tubo de centrifugación de 15 mL con tapón de vidrio, agregue 5.0 mL de éter, agite mecánicamente durante 30 minutos y centrifugue a 1000 rpm durante 15 minutos o hasta obtener una separación limpia. Aplique 200 μL del sobrenadante, en porciones de 40 μL , para obtener una mancha única de no más de 10 mm de diámetro en una placa para cromatografía de capa fina adecuada (ver Cromatografía <621>) recubierta con una capa de 0.25 mm de mezcla de gel de sílice para cromatografía. De igual forma, aplique 40 μL de una solución estándar en éter que contenga 10 μg de p-cloroacetanilida por mL y deje que las manchas se sequen. Desarrolle el cromatograma en una cámara no saturada con una fase móvil constituida por una mezcla de éter de petróleo y acetona (75:25) hasta que el frente del solvente haya recorrido tres cuartos de la longitud de la placa. Retire la placa de la cámara de desarrollo, marque el frente de la fase móvil y permita que el solvente se evapore. Localice las manchas del cromatograma examinándolo bajo luz UV de longitud de onda corta.

m. **Sustancias fácilmente carbonizables <271>**: Disuelva 0.50 g de la sustancia en 5 mL de ácido sulfúrico SR.

<271> En pruebas para sustancias rápidamente carbonizables, a menos que se señale de otro modo, añada la cantidad específica de la sustancia, finamente pulverizada en forma sólida, en pequeñas porciones con respecto al tubo de comparación, el cual está hecho de vidrio incoloro resistente a la acción del ácido sulfúrico y contiene el volumen específico de ácido sulfúrico TS (Solución Prueba según siglas en inglés).

Revuelva la mezcla con un policia hasta que se complete la disolución, permita que la solución se mantenga por 15 minutos, a menos que se señale de otro modo, y compare el color de la solución con el fluido específico correspondiente en un tubo de comparación, el cual es de vidrio incoloro y con las mismas dimensiones internas y de sección cruzada observando los fluidos transversalmente contra un fondo de porcelana blanca o de vidrio blanco.

n. **Impurezas orgánicas volátiles, Método V <467>**:

Disolvente: Usar dimetil sulfóxido.

<467> Se utiliza un cromatógrafo de gases capaz de programar la temperatura y equipado con una columna abierta y un detector de ionización de llama en el siguiente procedimiento:

Solución Estándar: Prepare una solución en agua libre de sustancias orgánicas o en el solvente especificado en la monografía, que contenga, en cada mL, 12

μg de cloruro de metileno, 7.6 μg de 1,4-dioxano, 1.6 μg de tricloroetileno y 1.2 μg de cloroformo [Prepare fresco cada día].

Solución Prueba: Disuelva en agua libre de sustancias orgánicas o el solvente especificado en la monografía, una porción pesada con precisión del material analizado para obtener una solución final con una concentración conocida de cerca de 20 mg del químico farmacéutico a granel por mL.

Sistema Cromatográfico (ver cromatografía <621>): El cromatógrafo de gases está equipado con un detector de ionización de llama, una columna analítica de 0.53 mm x 30 m de sílica fundida rellena con una fase estacionaria de 3.0 μm químicamente cruzada G43 y una pre-columna de 0.53 mm x 5 m desactivada con fenilmetil siloxano. El gas portador usado es helio con una velocidad lineal de cerca de 35 cm por segundo [El nitrógeno puede sustituirlo]. La temperatura del puerto de inyección y del detector es mantenida entre 140 °C y 260 °C, respectivamente. La temperatura de la columna es programada de acuerdo a lo siguiente: se mantiene a 40 °C por 20 minutos, luego se aumenta rápidamente a 240 °C y se mantiene a 240 °C por 20 minutos.

Inyecte la Solución Estándar y registre las respuestas de los picos como se establece en el procedimiento: Un sistema adecuado es aquel que lleva cromatogramas en los cuales todos los componentes en la Solución Estándar son resueltos (separados); la resolución, R, entre cada dos componentes no

debe ser menor de 3.0; y la desviación estándar relativa de las respuestas de los picos individuales de inyecciones repetidas no es mayor de 15%.

Procedimiento: Separadamente inyecte volúmenes iguales (1 μL) de la Solución Estándar y de la Solución Prueba en un cromatógrafo, registre los cromatogramas y mida las respuestas de los picos.

Identifique, basado en el tiempo de retención, cualquier pico presente en el cromatograma de la Solución Prueba. La identidad y respuesta del pico en el cromatograma pueden ser establecidas para una impureza orgánica como se establece en la Tabla N° 1 o por cualquier impureza volátil eluida con un tiempo de retención comparable por espectrofotometría de masa o por el uso de una segunda columna validada que contenga una fase estacionaria diferente.

TABLA N° 1. Límites de Impurezas Orgánicas Volátiles.

Impurezas Orgánicas Volátiles	Límites ($\mu\text{g/g}$)
Cloroformo	60
1,4 Dioxano	380
Cloruro de Metileno	600
Tricloroetileno	80

A menos que se especifique otra cosa en la monografía individual, la cantidad de cada impureza orgánica volátil presente en el material no debe exceder el límite dado en la tabla.

- o. Valoración o Ensayo:** Disuelva aproximadamente 120 mg de Acetaminofén, pesados con exactitud, en 10 mL de metanol en un frasco volumétrico de 500 mL; diluya hasta volumen con agua y mezcle. Transfiera 5.0 mL de esta

solución a un frasco volumétrico de 100 mL, diluya hasta volumen con agua y mezcle. Determine concomitantemente las absorbancias de esta solución y de una Solución estándar de Acetaminofén ER USP, en el mismo medio, a una concentración de aproximadamente 12 µg por mL en celdas de 1 cm de espesor, a la longitud de onda de absorbancia máxima, aproximadamente a 244 nm, con un espectrofotómetro adecuado usando agua como blanco. Calcule la cantidad, en mg, de C₈H₉NO₂ (Acetaminofén) por la fórmula: $10 C (A_U / A_S)$, en donde C es la concentración, en µg por mL, de Acetaminofén ER USP en la Solución Estándar; y A_U y A_S son las absorbancias de la solución de Acetaminofén y de la Solución Estándar, respectivamente.

2. CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA.

- a. **Definición de potencia:** El Clorhidrato de Piridoxina no debe contener menos de 98.0 % ni más de 102.0 % de C₈H₁₁NO₃ · HCl, calculado en base seca.
- b. **Sustancia de Referencia USP <11>:** Clorhidrato de Piridoxina ER USP.
- c. **Identificación:**

A: Absorción Infrarroja <197 M>:

<197 M> La sustancia analizada se tritura finamente y se dispersa con unas gotas de aceite mineral.

B: Responde a las pruebas para Cloruro <191>:

<191> Las soluciones de cloruro con nitrato de plata TS producen un precipitado blanco que es insoluble en ácido nítrico pero es soluble en un pequeño exceso de hidróxido de amonio 6N. Cuando se prueban aminas

(incluyendo alcaloides), a los clorhidratos que no responden a esta prueba, se les agrega 1 gota de ácido nítrico diluido y 0.5 mL de nitrato de plata TS a una solución de la sustancia examinada conteniendo, a menos que la monografía especifique lo contrario, cerca de 2 mg del ión cloruro en 2 mL: se debe formar un precipitado blanco en forma de cuajo. Centrifugue la mezcla inmediatamente y decante la capa sobrenadante. Lave el precipitado con tres porciones de 1 mL de una solución de ácido nítrico (1 en 100) y descarte los lavados. Agregue amonía TS, gota a gota, al precipitado. Debe disolverse rápidamente. Cuando la monografía especifique que un artículo responde a la prueba para cloruro seco, mezcle el sólido con un peso igual de dióxido de manganeso, humedezca con ácido sulfúrico y suavemente caliente la mezcla: la presencia de cloruro se reconoce por la producción de un color azul cuando se humedece con papel de almidón yodado.

d. **Pérdida por secado <731>**: Secar al vacío sobre sílica gel durante 4 horas.

<731> El procedimiento determina la cantidad de material volátil de cualquier clase que se encuentre bajo las condiciones específicas. Mezcle y pese con precisión la sustancia analizada y, a menos que la monografía establezca lo contrario, conduzca la determinación en 1 a 2 g. Si la especie tiene forma de cristales largos, reduzca el tamaño de las partículas triturándolo hasta cerca de 2 mm. Tare un envase de pesar que se ha secado por 30 minutos bajo las mismas condiciones que se emplean en la determinación. Ponga la muestra en

el envase, reemplace la tapa y pese el envase y el contenido. Suavemente, de lado, agitando, distribuya la muestra uniformemente y sumérjalo cerca de 5 mm y no más de 10 mm en el caso de materiales voluminosos. Coloque el envase en la cámara de secado, removiendo la tapa y dejándolo en la cámara. Seque la muestra a la temperatura y al tiempo especificado en la monografía. [la temperatura especificada en la monografía debe estar dentro del rango de ± 2 °C de la establecida]. Luego de abrir la cámara, cierre el envase rápidamente y permita que obtenga la temperatura ambiente en un desecador antes de pesarlo.

Si la sustancia se funde a una temperatura más baja que la especificada por la prueba, mantenga el envase con sus contenidos por 1 a 2 horas a una temperatura de 5 °C a 10 °C debajo de la temperatura de fusión, luego seque a la temperatura especificada.

e. Residuo por ignición <281>:

<281> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

f. Metales Pesados, Método II <231>:

<231> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

g. Impurezas Orgánicas Volátiles, Método I <467>:

<467> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

h. Contenido de Cloruro: Disuelva aproximadamente 500 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de metanol en un frasco con tapa de vidrio. Agregue 5

mL de ácido acético glacial, 2 a 3 gotas de eosina Y SR y valore con nitrato de plata 0.1 N SV. Cada mL de nitrato de plata 0.1 N equivale a 3.545 mg de Cl.

i. Valoración o Ensayo:

Fase móvil: Mezcle 20 mL de ácido acético glacial, 1.2 g de 1-hexanosulfonato de sodio y aproximadamente 1400 mL de agua en un frasco volumétrico de 2000 mL. Ajuste con ácido acético glacial o con hidróxido de sodio 1 N a un pH de 3.0. Agregue 470 mL de metanol, diluya a volumen con agua, mezcle y filtre utilizando un filtro con tamaño de poro de 0.5 μ m. Haga los ajustes necesarios (ver Aptitud del Sistema en Cromatografía <621>)

Solución del Estándar Interno: Disuelva ácido p-hidroxibenzóico con la fase móvil hasta obtener una solución con una concentración de 5 mg por mL.

Preparación Estándar: Disuelva aproximadamente 50 mg de Clorhidrato de Piridoxina ER USP, pesados con exactitud, en la Fase móvil en un matraz volumétrico de 100 mL, diluya a volumen con la fase móvil y mezcle. Transfiera 10.0 mL de la solución resultante a un frasco volumétrico de 100 mL, agregue 1.0 mL de la solución del estándar interno, diluya a volumen con la fase móvil y mezcle para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0.05 mg por mL.

Preparación Valoración: Disuelva aproximadamente 50 mg de Clorhidrato de Piridoxina, pesados con exactitud, con la fase móvil en un frasco volumétrico de 100 mL, diluya a volumen con la fase móvil y mezcle. Transfiera 10.0 mL de la solución resultante a un frasco volumétrico de 100 mL, agregue 1.0 mL

de la solución del estándar interno, diluya a volumen con la fase móvil y mezcle.

Sistema Cromatográfico (Cromatografía <621>): Equipe un cromatógrafo líquido con un detector a 280 nm y una columna de 4.6 mm x 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1.5 mL por minuto. Inyecte la Preparación Estándar y registre el cromatograma según se indica en el Procedimiento: la resolución, R, entre los picos de piridoxina y de ácido p-hidroxibenzóico no es menor de 2.5 y la desviación estándar relativa de inyecciones repetidas no es más de 3.0 %.

Procedimiento: Inyecte, por separado en el cromatógrafo, volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la Preparación Estándar y de la Preparación de Valoración; registre los cromatogramas y mida las respuestas de los picos principales. Los tiempos de retención relativos son de aproximadamente 0.7 para piridoxina y 1.0 para ácido p-hidroxibenzóico. Calcule la cantidad, en mg, de $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ en la porción de Clorhidrato de Piridoxina tomada, por la fórmula: $1000 C (R_U / R_S)$, en donde C es la concentración, en mg por mL, de Clorhidrato de Piridoxina ER USP en la Preparación Estándar; y R_U y R_S son los cocientes de respuesta entre los picos de Piridoxina y del Estándar Interno obtenidos a partir de la Preparación de Valoración y de la Preparación Estándar, respectivamente.

3. CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL.

a. **Definición de Potencia:** El Clorhidrato de Propranolol no debe contener menos de 98.0 % ni más de 101.5 % de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$, calculado en base seca.

b. **Sustancia de Referencia USP <11>:** Clorhidrato de Propranolol ER USP.

c. **Identificación:**

A: Absorción Infrarroja <197 M>:

<197 M> La sustancia analizada se tritura finamente y se dispersa con unas gotas de aceite mineral.

B: El tiempo de retención del pico principal de propranolol en el cromatograma de la Preparación de Valoración corresponde con el del cromatograma de la Preparación Estándar, como se obtienen en la valoración.

C: Responde a las pruebas para Cloruro <191>:

<191> Ver Procedimiento en Monografía de Clorhidrato de Piridoxina..

d. **Intervalo de fusión, Clase Ia <741>:**

<741> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

e. **Rotación específica <781S>:**

Solución Prueba: 40 mg por mL en agua.

<781S> Significa que la rotación específica es calculada a partir de las rotaciones ópticas observadas en la Solución Prueba obtenida como se indica.

A menos que se indique lo contrario, las medidas de la rotación óptica se

obtienen a 589 nm a 25 °C. Cuando el polarímetro fotoeléctrico es usado, se realiza una sola medida, corregida por el blanco (solvente). Cuando se emplea el polarímetro visual, se debe utilizar el promedio de no menos de 5 determinaciones, corregidas por las lecturas del mismo tubo con un blanco (solvente). La temperatura, que se aplica a la solución o al líquido en estudio, debe ser mantenido entre los 5 °C del valor establecido. Use la misma celda para la muestra y para el blanco. Mantenga la misma orientación angular de la celda en cada lectura. Coloque la celda de manera que la luz pase a través de ésta en la misma dirección en cada medida. A menos que se indique lo contrario, la rotación específica es calculada en base seca cuando la prueba de pérdida por secado es especificada en la monografía o en base anhidra cuando la prueba de agua es especificada.

f. **Pérdida por secado <731>**: Seque a 105 °C por 4 horas.

<731> Ver Procedimiento en Monografía de Clorhidrato de Piridoxina.

g. **Residuo por ignición <281>**:

<281> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

h. **Impurezas Orgánicas Volátiles, Método I <467>**:

<467> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

i. **Valoración o Ensayo:**

Fase Móvil: Disuelva 0.5 g de dodecilsulfato de sodio en 18 mL de ácido fosfórico 0.15 M, agregue 90 mL de acetonitrilo y 90 mL de metanol, diluya con agua hasta obtener 250 mL, mezcle y pase a través de un filtro de 0.5 µm

o de menor tamaño de poro. Hacer ajustes si es necesario (ver Aptitud del sistema en cromatografía <621>).

Preparación Estándar: Disuelva cuantitativamente una cantidad pesada con exactitud de Clorhidrato de Propranolol ER USP en metanol para obtener una solución madre con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL. Transfiera 5.0 mL de esta solución a un frasco volumétrico de 25 mL, diluya a volumen con metanol, mezcle y pase a través de un filtro de tamaño de poro de 0.7 μm o menor. Esta solución contiene aproximadamente 0.2 mg de Clorhidrato de Propranolol ER USP por mL.

Solución de Resolución: Prepare una solución de Clorhidrato de Procainamida en metanol que contenga aproximadamente 0.25 mg por mL. Transfiera 5 mL de esta solución y 5 mL de la solución madre utilizada para preparar la Preparación Estándar a un frasco volumétrico de 25 mL, diluya hasta volumen con metanol y mezcle.

Preparación de Valoración: Transfiera aproximadamente 50 mg de Clorhidrato de Propranolol, pesados con exactitud, a un frasco volumétrico de 50 mL, agregue 45 mL de metanol, agite y someta a ultrasonido durante 5 minutos. Diluya hasta volumen con metanol, mezcle y pase por un filtro de tamaño de poro de 0.7 μm o menor. Transfiera 5.0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 25 mL, diluya hasta volumen con metanol y mezcle.

Sistema Cromatográfico (Cromatografía <621>): Equipe un cromatógrafo líquido con un detector a 290 nm y una columna de 4.6 mm x 25 cm rellena

con material L7 de 5 μm . La velocidad de flujo es de aproximadamente 1.5 mL por minuto. Inyecte la Solución de Resolución y registre el cromatograma según se indica en el Procedimiento: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0.6 para procainamida y 1.0 para propranolol; y la resolución, R, entre el pico de procainamida y el pico de propranolol no es menor de 2.0. Inyecte la Preparación Estándar y registre el cromatograma según se indica en el procedimiento: el factor de asimetría para el pico de Propranolol no es mayor de 3.0 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2.0%.

Procedimiento: Inyecte por separado volúmenes iguales (aproximadamente 20 μL) de la Preparación Estándar y de la Preparación de Valoración en el cromatógrafo, registre los cromatogramas y mida las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcule la cantidad, en mg, de $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$ en la porción de Clorhidrato de Propranolol tomadas por la fórmula: $250 C (r_u/r_s)$, en donde C es la concentración, en mg por mL, de Clorhidrato de Propranolol ER USP en la Preparación Estándar; y r_u y r_s son las respuestas correspondientes al pico de Propranolol obtenido a partir de la Preparación de Valoración y de la Preparación Estándar, respectivamente.

4. CLORHIDRATO DE RANITIDINA.

- a. **Definición de Potencia:** El Clorhidrato de Ranitidina no debe contener menos de 97.5 % ni más de 102.0 % de $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3\text{S} \cdot \text{HCl}$, calculado en base seca.

b. **Sustancia de Referencia USP <11>**: Clorhidrato de Ranitidina ER USP.
Compuesto Relacionado A de Ranitidina ER USP, Compuesto Relacionado B de Ranitidina ER USP, Compuesto Relacionado C de Ranitidina ER USP.

c. **Identificación:**

A: Absorción Infrarroja <197 M>:

<197 M> La sustancia analizada se tritura finamente y se dispersa con unas gotas de aceite mineral.

B: Absorción Ultravioleta <197 U>:

Solución: 10 µg por mL.

Medio: agua.

<197 U> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

C: Una solución de esta sustancia cumple con los requisitos de las pruebas para Cloruro <191>:

<191> Ver Procedimiento en Monografía de Clorhidrato de Piridoxina.

d. **pH <791>**: Solución 1 en 100.

e. **Pérdida por secado <731>**: Seque al vacío a 60 °C durante 3 horas.

<731> Ver Procedimiento en Monografía de Clorhidrato de Piridoxina.

f. **Residuo por ignición <281>**:

<281> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

g. **Pureza Cromatográfica:**

Solución Prueba: Prepare una solución en metanol que contenga 22.3 mg por mL de Clorhidrato de Ranitidina.

Solución Estándar: Disuelva una cantidad pesada con exactitud de Clorhidrato de Ranitidina ER USP en metanol y diluya con el mismo solvente para obtener la Solución Estándar A, con una concentración conocida de aproximadamente 0.22 mg por mL. Diluya cuantitativamente porciones de la Solución Estándar A en metanol para obtener Soluciones Estándar B, C y D, teniendo concentraciones conocidas de 110 µg por mL, 66 µg por mL y 11 µg por mL, respectivamente.

Solución de Resolución: Disuelva una cantidad pesada con exactitud del Compuesto Relacionado A de Ranitidina ER USP en metanol para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1.27 mg por mL.

Preparación para Identificación: Disuelva una cantidad pesada con exactitud del Compuesto Relacionado B de Ranitidina ER USP en metanol para obtener una solución con una concentración conocida aproximada de 1 mg por mL.

Procedimiento: Aplique, por separado, 10 µL de la Solución de Prueba, 10 µL de cada una de las Soluciones Estándar y 10 µL de la Solución para Identificación a una placa de cromatografía de capa fina (ver Cromatografía <621>). Separadamente aplique 10 µL adicionales de la Solución de Prueba a la misma placa y sobre esta aplicación, aplicar 10 µL de la Solución de Resolución. Deje que se sequen las aplicaciones y se desarrollen los cromatogramas en una fase móvil constituida por una mezcla de acetato de etilo, alcohol isopropílico, hidróxido de amonio y agua (25:15:5:1) hasta que

el frente de la fase móvil haya recorrido no más de 15 cm desde el origen. Retire la placa de la cámara de desarrollo, marque el frente de la fase móvil y deje que la placa se seque al aire. Exponga la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada hasta que el cromatograma se revele completamente. Examine la placa y compare las intensidades de las manchas secundarias observadas en el cromatograma de la Solución de Prueba con las de las manchas principales en los cromatogramas de las Soluciones Estándar A, B, C y D y la Solución para Identificación.

h. Impurezas Orgánicas Volátiles: Método IV <467>:

<467> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

i. Valoración o Ensayo:

Fase móvil: Prepare una mezcla filtrada y degasificada de metanol y acetato de amonio acuoso 0.1 M (85:15). Hacer ajustes si es necesario (ver Aptitud del Sistema en Cromatografía <621>).

Preparación Estándar: Disuelva una cantidad, pesada con exactitud, de Clorhidrato de Ranitidina ER USP en la fase móvil para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0.112 mg (equivalente a 0.100 mg de Base de Ranitidina) por mL.

Valoración de Aptitud del Sistema: Disuelva cantidades pesadas con exactitud de Clorhidrato de Ranitidina ER USP y del Compuesto Relacionado C ER USP en la fase móvil para obtener una solución con concentraciones

conocidas de aproximadamente 0.112 mg por mL y 0.01mg por mL, respectivamente.

Preparación de Valoración: Transfiera aproximadamente 112 mg de Clorhidrato de Ranitidina, pesados con exactitud, a un frasco volumétrico de 100 mL. Disuelva y diluya a volumen con la fase móvil y mezcle. Transfiera 1.0 mL de esta solución a un frasco volumétrico de 10 mL, diluya a volumen con la fase móvil y mezcle.

Sistema Cromatográfico (ver Cromatografía <621>): Equipe un cromatógrafo líquido con un detector a 322 nm y una columna 4.6 mm x 20 a 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo debe ser de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyecte la solución de aptitud del sistema y registre los cromatogramas según se indica en el procedimiento: la resolución, R, entre el Clorhidrato de Ranitidina y el N-[2-[[[5-[dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]sulfinil]etil]-N'-metil-2-nitro-1,1-etenediamina (Compuesto relacionado C de ranitidina) no debe ser menor de 1.5.

Inyecte la Solución de Resolución y registre el cromatograma según se indica en el Procedimiento: el factor de asimetría para el pico de Clorhidrato de Ranitidina no es mayor de 2.0; la eficiencia de la columna determinada a partir del pico de Clorhidrato de Ranitidina no es menor de 700 platos teóricos y la Desviación Estándar Relativa para las inyecciones repetidas no es más de 2%.

Procedimiento: Inyecte por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la Preparación Estándar y de la Preparación de Valoración, registre los cromatogramas y mida las áreas correspondientes a los picos principales. Calcule la cantidad, en mg, de $C_{13}H_{22}N_4O_3S \cdot HCl$ en la porción de Clorhidrato de Ranitidina tomada por la fórmula: $1000 C (r_U/r_S)$ en donde C es la concentración, en mg por mL, de Clorhidrato de Ranitidina ER USP en la Preparación Estándar; y r_U y r_S son las respuestas correspondientes a los picos obtenidos a partir de la Preparación de Valoración y la Preparación Estándar, respectivamente.

5. CLORHIDRATO DE VERAPAMILO.

- a. **Definición de Potencia:** El Clorhidrato de Verapamilo no debe contener menos de 99.0 % ni más de 100.5 % de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$, calculado en base seca.
- b. **Sustancia de Referencia USP <11>:** Clorhidrato de Verapamilo ER USP. Compuesto Relacionado B de Verapamilo ER USP.
- c. **Identificación:**
 - A: Absorción Infrarroja <197 K>:

<197 K> La sustancia analizada se tritura finamente y se dispersa con unas gotas de bromuro de potasio.
 - B: El tiempo de retención del pico principal para Verapamilo en el cromatograma de la Preparación Prueba corresponde con el cromatograma

de la Preparación Estándar B, según se obtiene en la prueba de pureza cromatográfica.

C: Responde a las pruebas para Cloruro <191>:

<191> Ver Procedimiento en Monografía de Clorhidrato de Piridoxina.

d. Intervalo de fusión <741>:

<741> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

e. pH <791>: en una solución preparada por calentamiento moderado que contenga 50 mg por mL.

f. Pérdida por secado <731>: Seque a 105 °C durante 2 horas.

<731> Ver Procedimiento en Monografía de Clorhidrato de Piridoxina.

g. Residuo por ignición <281>:

<281> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

h. Pureza Cromatográfica:

Mezcla de Solvente Acuoso: Prepare una solución de acetato de sodio 0.015N que contenga aproximadamente 33 mL de ácido acético glacial por litro.

Fase móvil: Prepare una mezcla filtrada y degasificada de la Mezcla de Solvente Acuoso, acetonitrilo y 2-aminoheptano (70:30:0.5). Hacer ajustes si es necesario (ver Aptitud del Sistema en Cromatografía <621>).

Preparaciones Estándar: Disuelva una cantidad pesada con exactitud de Clorhidrato de Verapamilo ER USP en la fase móvil y diluya cuantitativamente con la fase móvil, si es necesario hacerlo en varias diluciones sucesivas, para obtener la Preparación Estándar A y la Preparación

Estándar B con concentraciones conocidas de aproximadamente 5.6 y 9.4 μg por mL, respectivamente.

Preparación Prueba: Prepare una solución de Clorhidrato de Verapamilo en la fase móvil con una concentración conocida de aproximadamente 1.9 mg por mL.

Solución de Aptitud del Sistema: Disuelva cantidades adecuadas de Clorhidrato de Verapamilo ER USP y Compuesto Relacionado B de Verapamilo ER USP en la fase móvil para obtener una Solución de Aptitud del Sistema con concentraciones conocidas de aproximadamente 1.9 y 1.5 mg, respectivamente, por mL.

Sistema Cromatográfico (ver Cromatografía <621>): Equipe un cromatógrafo líquido con un detector a 278 nm y una columna de 4.6 mm x 12.5 cm a 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0.9 mL por minuto. Inyecte la Solución de Aptitud del Sistema y registre el cromatograma según se indica en el Procedimiento: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0.88 para el Compuesto Relacionado B de Verapamilo y 1.0 para Verapamilo; la resolución, R, entre el pico del Compuesto Relacionado B de Verapamilo y el pico de Verapamilo no es menor de 1.5 y la Desviación Estándar Relativa para inyecciones repetidas no es más de 2.0 %.

Procedimiento: Inyecte por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μL) de las Preparaciones Estándares A y B y de la

Preparación Prueba y deje que eluya la Preparación Prueba por un tiempo no menor de cuatro veces el tiempo de retención de Verapamilo. Registre los cromatogramas y mida las respuestas de todos los picos. La suma de las respuestas de los picos, a excepción de la de Verapamilo, obtenidas a partir de la Preparación Prueba no es mayor que la respuesta del pico de Verapamilo obtenida de la Preparación Estándar B (0.5 %) y ninguna respuesta de un pico individual es mayor que la respuesta del pico de Verapamilo obtenida a partir de la Preparación Estándar A (0.3 %).

h. Impurezas Orgánicas Volátiles, Método V <467>:

Disolvente: Usar n-propanol al 0.1 % en agua.

<467> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

i. Valoración o Ensayo: Disuelva aproximadamente 400 mg de Clorhidrato de Verapamilo, pesados con exactitud, en 40 mL de ácido acético glacial y agregue 10 mL de acetato mercurico SR y 5 mL de anhídrido acético. Valore volumétricamente (ver Volumetría <541>) con ácido perclórico 0.10N SV, determinando el punto estequiométrico potenciométricamente. Realice la determinación de un blanco y haga las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0.10N equivale a 49.11 mg de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$.

6. TRIMETOPRIM.

a. Definición de Potencia: El Trimetoprim no debe contener menos de 98.5 % ni más de 101.0 % de $C_{14}H_{18}N_4O_3$, calculado en base seca.

b. Sustancia de Referencia USP <11>: Trimetoprim ER USP.

c. Identificación:

A: Absorción Infraroja <197 S>:

Solución: 1 en 100.

Medio: cloroformo.

<197 S> La sustancia analizada se tritura finamente y se dispersa en unas gotas de cloroformo.

B: Absorción UV: Transfiera aproximadamente 100 mg, pesado con exactitud, a un frasco volumétrico de 100 mL y disuelva en 25 mL de alcohol. Diluya cuantitativamente poco a poco con una solución de hidróxido de sodio (1 en 250) para obtener una solución 1 en 50,000.

d. Intervalo de fusión: Clase 1a <741>:

<741> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

e. Pérdida por secado <731>: Seque a 105 °C por 4 horas.

<731> Ver Procedimiento en Monografía de Clorhidrato de Piridoxina.

f. Residuo por ignición: <281>:

<281> Ver Procedimiento en Monografía de Acetaminofén.

g. Pureza cromatográfica:

Solución Amortiguadora: Prepare una solución de Perclorato de Sodio 10 mM en agua, ajustando con Ácido Fosfórico a un pH de 3.6 y mezcle.

Fase Móvil: Prepare una mezcla filtrada y degasificada de la Solución Amortiguadora y Metanol (7:3). Hacer los ajustes necesarios (ver Aptitud del Sistema en Cromatografía <621>).

Solución de Resolución: Disuelva cantidades pesadas con exactitud de Trimetoprim ER USP y Diaveridina; diluya cuantitativamente con la fase móvil, si fuera necesario hacerlo en diluciones sucesivas, para obtener soluciones con concentraciones conocidas de aproximadamente 10 µg por mL y 5 µg por mL, respectivamente.

Solución Prueba: Transfiera aproximadamente 25.0 mg de Trimetoprim, pesado con exactitud, en un frasco volumétrico de 25 mL, disuelva y diluya con fase móvil hasta alcanzar el volumen y mezcle.

Sistema Cromatográfico (ver Cromatografía <621>): Equipe un cromatógrafo líquido con un detector a 280 nm y una columna de 4.6 mm x 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1.3 mL por minuto. Inyecte la solución de resolución y registre el cromatograma según se indica en el Procedimiento: la resolución, R, entre el pico de Trimetoprim y Diaveridina no es mayor de 2.5; y la Desviación Estándar Relativa para inyecciones repetidas no es más de 2.0 %.

Procedimiento: Inyecte un volumen (aproximadamente 20 µL) de la Solución Prueba en el cromatógrafo, registre el cromatograma por no menos de 11 veces el tiempo de retención del pico de Trimetoprim y mida las respuestas de todos los picos. Calcule el porcentaje de cada impureza en la porción de Trimetoprim tomada por la fórmula: $100 \{F_{r_i} / [\sum(F_{r_i}) + F_{r_T}]\}$, en donde F es el Factor de Respuesta Relativo (y es igual a 0.5 para algún pico que tenga un tiempo de retención relativo de 0.9, 2.3, 2.7, y 10.3, y es igual a 1.0 para todos

los otros picos); r_i es la respuesta del pico de cada impureza; y r_T es la respuesta de Trimetoprim obtenido de la Solución de Prueba.

- h. **Valoración o Ensayo:** Transfiera aproximadamente 300 mg de Trimetoprim, pesado con exactitud, a un frasco volumétrico, agregue 60 mL de ácido acético glacial y valore con ácido perclórico 0.1 N SV. Determine el punto estequiométrico potenciométricamente. Realice la determinación de un blanco y haga las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0.1 N equivale a 29.03 mg de $C_{14}H_{18}N_4O_3$.

H. Instrumento de Recolección de Datos.

Tal como se establece en las Buenas Prácticas de Laboratorio, se cuenta con un Cuaderno de Trabajo donde se transcriben todos los métodos de las pruebas de las respectivas monografías que se le deben realizar a las Sustancias de Referencias Secundarias.

Además, se colocan todos los resultados obtenidos al evaluar las muestras a través de las pruebas.

I. Tabulación y Tratamiento de la Información.

Las muestras se realizaron por duplicados o triplicado. Luego se le aplicaron los estadísticos de sumatoria (Σ), promedio (\bar{x}), Desviación Estándar (SD) y Desviación Estándar Relativa (RSD) o Coeficiente de Variación (CV).

Se utilizó el programa Access de Microsoft Office para la tabulación y tratamiento de la información obtenida.

J. Emisión de Certificados de Análisis.

Luego de que se recopilaron todos los datos obtenidos al aplicar las pruebas de la monografía de la Farmacopea de los Estados Unidos XXVIII, se le emite un Certificado de Análisis, el cual diseñamos y proponemos que sea guardado en el Programa Access, donde se encuentra la base de datos de las Sustancias de Referencia Primarias y Secundarias que reposan en el Instituto Especializado de Análisis.

Capítulo III

PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A. PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS.

1. ACETAMINOFÉN.

a. Muestras evaluadas y Características Sensoriales:

Se evaluó un envase de la Sustancia de Referencia Secundaria de Acetaminofén. El contenido presenta las siguientes características: polvo cristalino blanco e inodoro, formando finos gránulos. Estas características concuerdan con las establecidas en la literatura revisada.

El recipiente que contenía la muestra era de plástico y de color blanco opaco. En su exterior presentaba una etiqueta que mostraba el nombre, número de lote, código interno y código del fabricante.

b. Sustancia de Referencia USP: Acetaminofén ER USP.

Se encontraba en un recipiente de vidrio de color ámbar. En su recipiente tiene el nombre, número de lote, cantidad, código interno. Antes de usarse, éste debió secarse sobre sílica gel por 18 horas. Se debe mantener el contenido herméticamente cerrado y protegido de la luz.

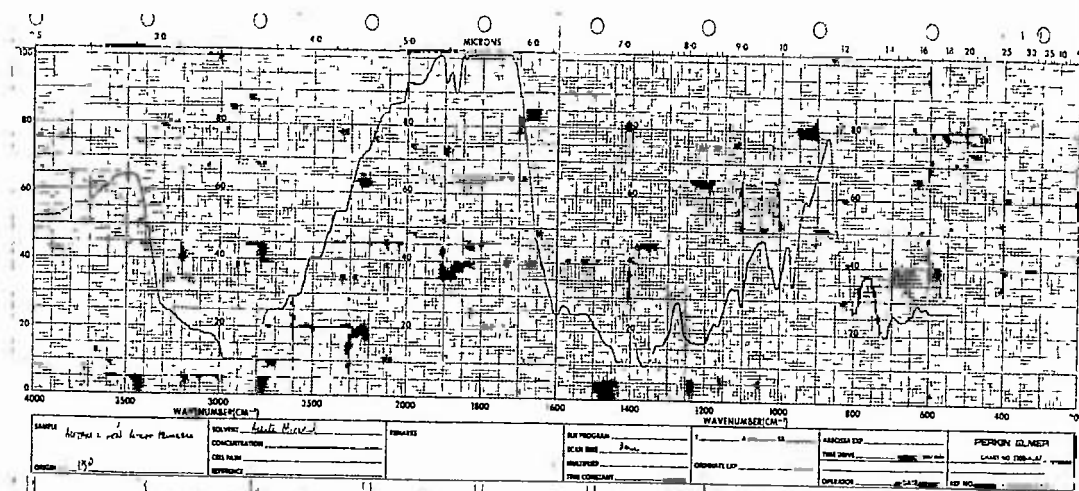
c. Identificación: Se realizaron las tres pruebas presentadas en la monografía de materia prima de Acetaminofén.

A: Absorción Infrarroja (IR):

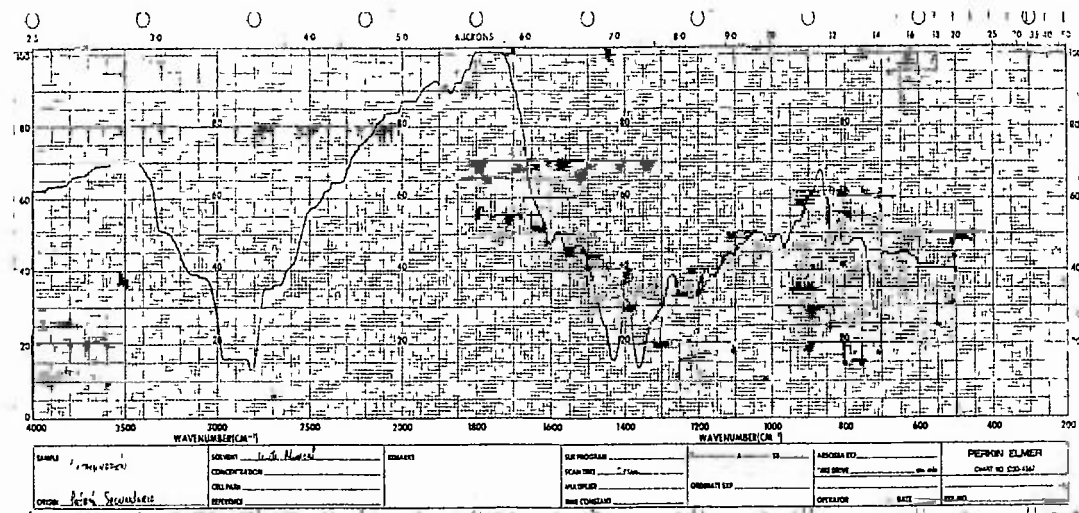
Tanto la Sustancia de Referencia evaluada como la Sustancia de Referencia USP se trituraron finamente y se dispersaron en dos gotas de aceite mineral. No se utilizó el bromuro de potasio, como lo establece la monografía, por problemas en la preparación de la pastilla y además no se

contaba con el adecuado recipiente para colocar la pastilla en el Espectrofotómetro IR. Se encontró que los espectros IR de la Sustancia de Referencia evaluada como de la Sustancia de Referencia USP son similares.

GRÁFICA N° 1. Espectro de Absorción IR de Acetaminofén (Sustancia de Referencia USP).



GRÁFICA N° 2. Espectro de Absorción IR de Acetaminofén (Sustancia de Referencia Secundaria).

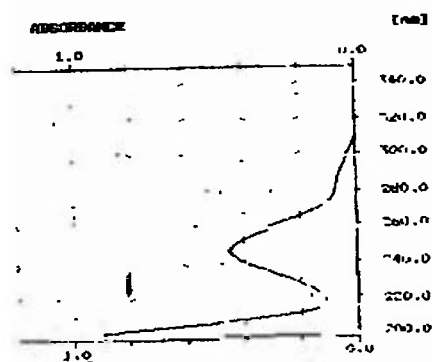


B: Absorción Ultravioleta (UV):

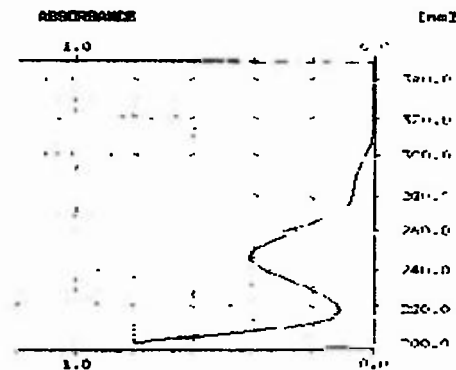
Se prepararon tres muestras de la Sustancia de Referencia evaluada de concentraciones 5.0 $\mu\text{g/mL}$, 5.05 $\mu\text{g/mL}$, 5.075 $\mu\text{g/mL}$ y una de la Sustancia de Referencia USP, de concentración 5.1 $\mu\text{g/mL}$, examinadas espectrofotométricamente, en celdas de 1 cm, en el rango de 200 a 400 nm.

GRÁFICA N° 3. Espectros de Absorción UV de las Sustancias de Referencia de Acetaminofén.

Sustancia de Referencia USP



Sustancia de Referencia Secundaria



Se puede apreciar en el siguiente cuadro los registros de los espectros UV y su comparación: las máximas y mínimas aparecen a las mismas longitudes de onda, por lo tanto se confirma la identidad.

TABLA N° 2. Valores de Absorción UV de Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Evaluada.

Sustancia de Referencia	N° de Muestras	Concentración (µg/mL)	Longitud de Onda (nm)	Absorbancias (A)	Absortividad o Razones de Absorbancias
USP	1	5.1	248.4	0.452	88.63
Secundaria	1	5.0	248.3	0.417	83.40
	2	5.05	248.4	0.411	81.39
	3	5.075	248.4	0.406	80.08
\bar{X}			248.4	0.411	81.62
SD			0.058	0.006	1.67
CV			0.023%	1.45%	2.04%

C: Responde a la Prueba de Identificación por Cromatografía en Capa Delgada:

Se utilizaron dos muestras de la Sustancia de Referencia evaluada y una de la Sustancia de Referencia USP. Se prepararon soluciones de concentraciones de 1.4 mg/mL y 1.1 mg/mL en metanol. La fase móvil estaba constituida por una mezcla de cloruro de metileno y metanol (4:1). Para esta evaluación se usaron dos placas con soportes diferentes, uno de aluminio y otro de vidrio, pero con la misma fase estacionaria (sílica gel), donde se colocaron todas las muestras en cada una. Se obtuvieron los siguientes valores de R_f (factores de retención) luego de que la Solución de la Sustancia de Referencia USP y la Solución de la Sustancia de Referencia evaluada hicieron el mismo recorrido.

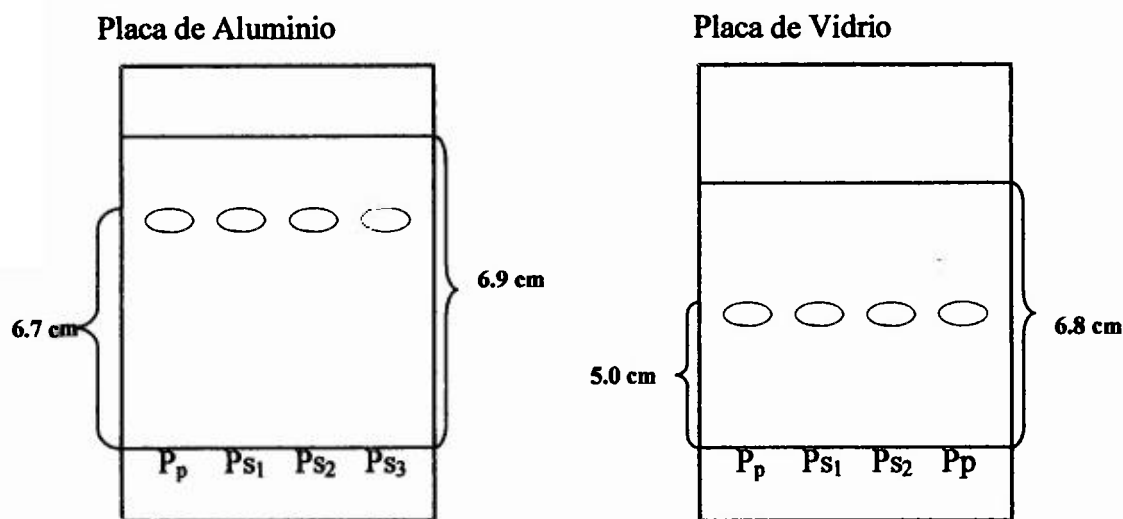
TABLA N° 3. Valores de R_f de Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Evaluada.

Sustancia de Referencia	N° de Muestras	Valores de R_f			
		Soporte de Aluminio	Soporte de Vidrio		
USP	1	0.971	0.86	0.75	0.63
Secundaria	1	0.971	0.87	0.75	0.63
	2	0.971	0.85	0.72	0.62

En todos los casos los valores de R_f de la mancha que corresponde a la Sustancia de Referencia evaluada de Acetaminofén está muy cercano al que corresponde a la Sustancia de Referencia USP, por lo que se puede concluir que la muestra y el patrón son la misma sustancia.

Es importante señalar que en ambos cromatogramas se observa la presencia de dos impurezas en ambas muestras, que de acuerdo a la literatura pueden ser p-aminofenol o p-cloroacetanilida.

GRÁFICA N° 4. Cromatogramas de las Sustancias de Referencia Acetaminofén en TLC.



P_p : Sustancia de Referencia Primaria.

P_s : Sustancia de Referencia Secundaria.

d. Intervalo de fusión:

Criterio de Aceptación: entre 168 °C y 172 °C.

Se realizó una lectura del Estándar de punto de fusión (Fenacetina N° 5 WHO) que utiliza el I.E.A. para determinar si el termómetro está dentro de calibración. Simultáneamente se hizo la prueba a la Sustancia de Referencia evaluada y a la Sustancia de Referencia USP. Se llenó cada capilar de vidrio, con suficiente cantidad del polvo seco para formar una columna en el fondo del tubo. Se calentó el baño, se insertó cada tubo capilar en el medio y se tomaron las lecturas con la ayuda del termómetro del baño. Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 4. Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Acetaminofén.

Sustancia	Punto de Fusión
Estándar Interno (p.f.= 135 °C)	134– 135 °C
Referencia USP	168 - 169 °C
Referencia Secundaria	169 – 171 °C

Por lo que se concluye que cumple con el criterio establecido para esta prueba.

e. Agua:

Criterio de Aceptación: no más de 0.5%.

Siguiendo las instrucciones del aparato de Karl Fischer, se requirió la utilización del reactivo Hydranal®- Composite 5 de Riedel- de Haën para la valoración volumétrica de las muestras.

Se realizó el secado por 18 horas, tanto para las tres muestras de la Sustancia de Referencia evaluada como para la Sustancia de Referencia USP. Se utilizó un Estándar de Agua (Hydranal[®]-Estándar de Agua-10.0 de Riedel-de Haën) para determinar el título de agua. Se pesan las muestras en un papel filtro hasta la cantidad requerida y óptima de aproximadamente 2 g. Se introducen en el aparato Karl Fisher y se pesa nuevamente para obtener, por diferencia, el peso real añadiendo al vaso de reacción.

TABLA N° 5. Valores de la Prueba Contenido de Agua en Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP y Sustancia de Referencia Evaluada.

Sustancia de Referencia	N° de Muestra	Peso (g)	%
USP	1	0.197	0.0357
Secundaria	1	0.1975	0.5890
	2	0.1963	0.6290
	3	0.1985	0.6367
\bar{X}		0.1974	0.6182
SD		0.0011	0.0256
CV		0.55 %	4.14 %

Podemos observar que las muestras no cumplen con el Criterio de Aceptación para esta prueba pues cada una de las muestras de la Sustancia de Referencia de Acetaminofén presentan una cantidad de agua superior a 0.5 %.

f. Residuo por ignición:

Criterio de Aceptación: no más de 0.1 %.

Se obtuvo un residuo por ignición de 0.37 % de la Sustancia de Referencia analizada, por lo que no cumple con el Criterio de Aceptación.

g. Cloruros:

Criterio de Aceptación: El filtrado no presenta más cloruro que el correspondiente a 0.20 mL de ácido clorhídrico 0.020N (0.014%).

Se preparó una solución de Ácido Clorhídrico 0.020N a partir de Ácido Clorhídrico Fumante. Se pesó aproximadamente 1.0030 g de Acetaminofén y se le añadió 25 mL de agua destilada y se filtró. Se colocaron 0.20 mL del filtrado en un tubo de ensayo y 0.20 mL de Ácido Clorhídrico 0.020N en otro. A los dos tubos se le agregó 1 mL de ácido nítrico 2N y 1 mL de nitrato de plata SR.

La solución de Ácido Clorhídrico 0.020N presentó inmediatamente turbidez mientras que la solución de la Sustancia de Referencia Secundaria se mantuvo transparente y luego cambió a una coloración amarillenta.

Se concluye que la solución de la Sustancia de Referencia Secundaria tiene menos Cloruro que la solución de Ácido Clorhídrico 0.020N.

h. Sulfatos:

Criterio de Aceptación: La mezcla no presenta más sulfato que el correspondiente a 0.20 mL de ácido sulfúrico 0.020N (0.02%).

Se pesó 1.0001 g de Acetaminofén y se disolvió en 25 mL de agua, se filtró y luego se agregaron 2 mL de ácido acético 1N y de cloruro de bario SR. Luego de la adición de dicha mezcla a la solución de Ácido Sulfúrico 0.020N presentó inmediatamente turbidez mientras que la solución de la Sustancia de Referencia Secundaria se mantuvo transparente.

Se concluye que la solución de la Sustancia de Referencia Secundaria tiene menos Sulfato que la solución de Ácido Sulfúrico 0.020N.

i. Sulfuros:

Criterio de Aceptación: no se observa coloración ni manchas en el papel de prueba.

Se pesaron aproximadamente 2.5 mg de acetaminofén y se disolvieron con 5 mL de alcohol y 1 mL de ácido clorhídrico 3N.

El papel prueba de acetato de plomo no presentó coloración ni manchas. Por lo tanto, la muestra no presenta sulfuros.

j. Metales pesados:

Criterio de Aceptación: 0.001%. El color de la solución de la Preparación Prueba no debe ser más oscuro que la Preparación Estándar.

Esta prueba no se realizó por falta del tubo de comparación de color.

k. p-aminofenol libre:

Criterio de Aceptación: La absorbancia de la Solución Prueba no excede la de la Solución Estándar, correspondiente a no más de 0.005% de p-aminofenol.

Esta prueba tampoco se realizó por falta del reactivo nitroferriicianuro de sodio y de carbonato de sodio que componen la solución.

l. Límite de p-cloroacetanilida:

Criterio de Aceptación: Cualquier mancha obtenida a partir de la solución en análisis, a un valor de R_F correspondiente a la mancha principal de la Solución estándar, no debe superar el tamaño ni la intensidad de la mancha principal

obtenida a partir de la Solución estándar, correspondiente a no más de 0.001% de p-cloroacetanilida.

Esta prueba no se realizó porque no se contaba con el patrón de p-cloroacetanilida.

m. Sustancias fácilmente carbonizables:

Criterio de Aceptación: La solución no tiene un color más intenso que la solución de Comparación A, <631> compuesta de 0.1 partes de cloruro, 0.4 partes de cloruro férrico, 0.1 partes de sulfato cúprico y 4.4 partes de agua.

Esta prueba no se realizó por falta del tubo de comparación de color.

n. Impurezas orgánicas volátiles.

Criterio de Aceptación: cumple con los requisitos.

Esta prueba no se realizó porque no se contaba con el equipo con las especificaciones requeridas.

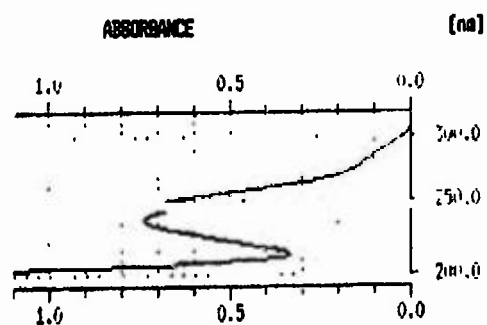
o. Valoración o Ensayo:

Criterio de Aceptación: Debe cumplir con la Definición de Potencia: no debe contener menos de 98.0 % ni más de 101.0 % de $C_8H_9NO_2$, calculado en base anhidra.

Se pesó 120.9 mg de la Sustancia de Referencia de Acetaminofén, se disolvió en 10 mL de metanol y se llevó a un volumen de 500 mL con agua. Se transfirieron 5.0 mL de esta solución a un frasco volumétrico de 100 mL, se llevó a volumen con agua y se mezcló. Esto se realizó por triplicado.

GRÁFICA N° 5. Espectros de Absorción para las Sustancias de Referencia de Acetaminofén.

Sustancia de Referencia USP



Sustancia de Referencia Secundaria

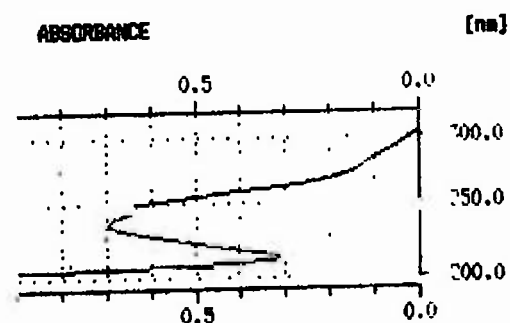


TABLA N° 6. Valores de Absorbancia del Ensayo de Acetaminofén de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Evaluada.

Sustancia de Referencia	N° de Muestra	Absorbancia (A)	Cantidad de $C_8H_9NO_2$ (mg)	% de Pureza
USP	1	0.738		100 %
Secundaria	1	0.711	117.53	97.21
	2	0.695	114.89	95.02
	3	0.709	117.20	96.93
\bar{X}		0.705	116.54	96.39
SD		0.01	1.43	1.18
CV		1.40 %	1.22 %	1.22 %

A través de esta fórmula $10 C (A_U / A_S)$, se obtuvieron las cantidades de $C_8H_9NO_2$ en las muestras de la Sustancia de Referencia Secundaria de Acetaminofén. Estas contienen un promedio de pureza de 96.39 % de $C_8H_9NO_2$, calculado en base anhidra, lo que representa un valor por debajo del rango de la Definición de Potencia. Las absorbancias se leyeron a 243.1 nm, longitud de onda máxima obtenida luego del barrido de la Sustancia de Referencia USP.

2. CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA.

a. Muestras evaluadas y Características Sensoriales:

Se evaluó un solo lote (envase) de la Sustancia de Referencia Secundaria. Posee entre sus características ser un polvo blanco, cristalino e inodoro. El recipiente que contenía la muestra era de vidrio de color ámbar. En su exterior presentaba una etiqueta que mostraba el nombre, número de lote, fecha de expiración, potencia y el código interno.

b. Sustancia de Referencia USP <11>: Clorhidrato de Piridoxina ER USP.

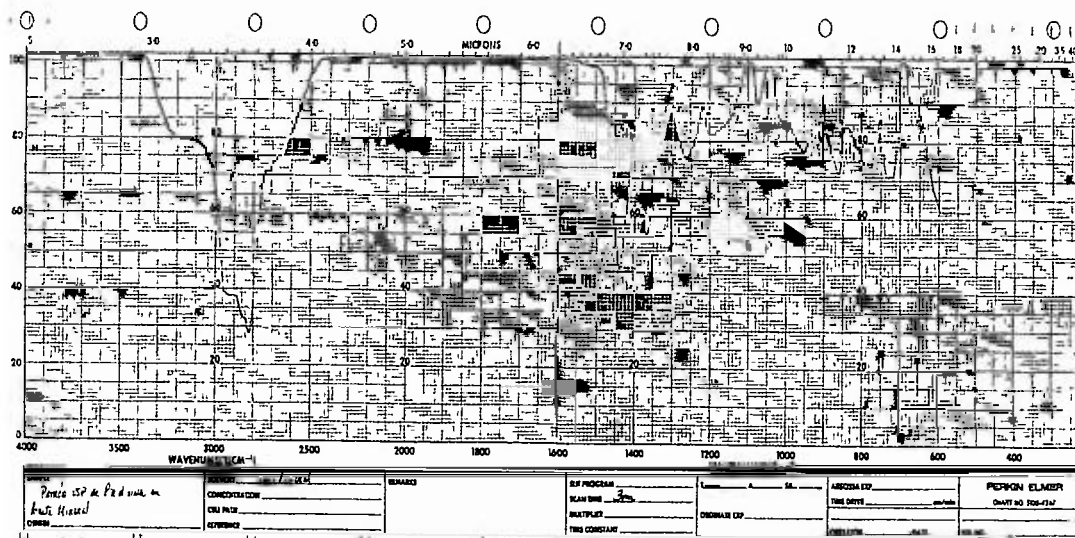
Se encontraba en un recipiente de vidrio de color ámbar. Antes de su utilización la porción debe secarse en vacío sobre sílica gel por 4 horas, luego debe mantenerse en un envase herméticamente cerrado y protegido de la luz.

c. Identificación: Se realizaron las dos pruebas presentadas en la monografía de la materia prima de Clorhidrato de Piridoxina.

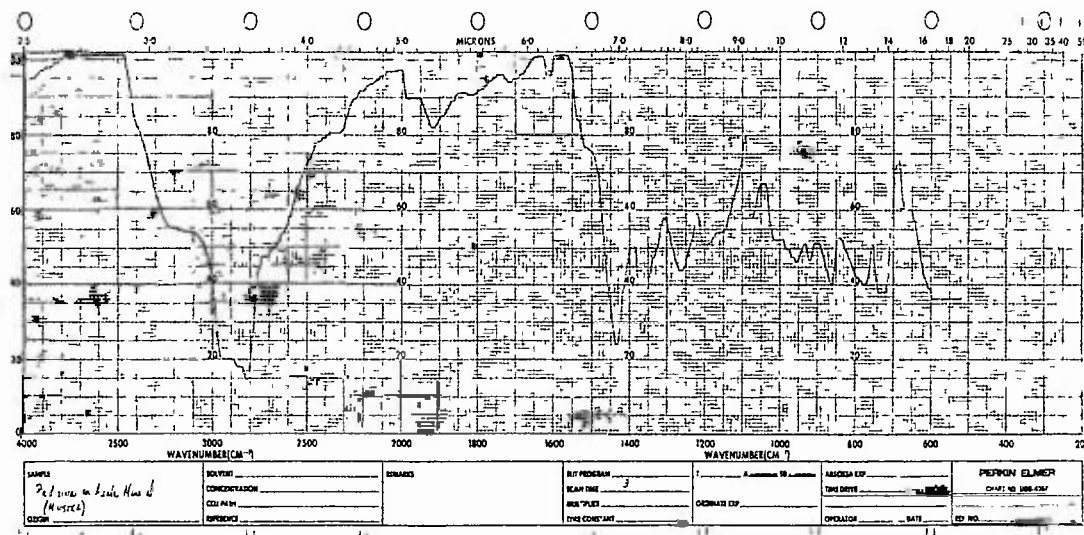
A: Absorción Infrarroja (IR):

Tanto la Sustancia de Referencia Evaluada como la Sustancia de Referencia USP se trituraron finamente y se dispersaron en dos gotas de aceite mineral. Los espectros de absorción IR fueron similares para ambas Sustancias de Referencia.

**GRÁFICA N° 6. Espectro de Absorción IR de Clorhidrato de Piridoxina.
(Sustancia de Referencia USP).**



**GRÁFICA N° 7. Espectro de Absorción IR de Clorhidrato de Piridoxina.
(Sustancia de Referencia Secundaria).**



B: Responde a las pruebas para Cloruro:

Criterio de Aceptación: el precipitado desaparece luego de la adición de amonía TS.

Se pesaron 16.7mg de la Sustancia de Referencia y 16.8 mg de la Sustancia de Referencia USP correspondientes a 2 mg de Cl. Se colocaron en tubos de ensayo en donde, se les agregó agua y se sonicaron por 4 minutos. Se agregaron los otros reactivos como ácido nítrico diluido y nitrato de plata TS, luego de lo cual se produjo un precipitado blanco. Se centrifugaron en los tubos y se decanta el agua. Se adicionó Amonia TS y desaparece el precipitado blanco.

Se concluye, entonces, que las muestras cumplen con el Criterio de Aceptación.

d. Pérdida por secado:

Criterio de Aceptación: no pierde más de 0.5 % de su peso.

Se procedió a secar 183.4 mg de la Sustancia de Referencia al vacío sobre sílica gel por 4 horas y se obtuvo un peso de 181.9 mg. Por diferencia, se obtiene la pérdida de un 0.81% por lo que no cumple con el criterio de aceptación que define que la pérdida no puede ser mayor de 0.5 % de su peso.

e. Residuo por ignición:

Criterio de Aceptación: no más de 0.1 %.

Se obtuvo un 0.099 % del residuo por ignición de la Sustancia de Referencia estudiada, por lo que cumple con el Criterio de Aceptación de esta prueba.

f. Metales Pesados:

Criterio de Aceptación: 0.003%

Esta prueba no se realizó por falta del tubo de comparación de color de la preparación estándar.

g. Impurezas Orgánicas Volátiles:

Criterio de Aceptación: cumple con los requisitos.

Esta prueba no se realizó pues no se contaba con el equipo con las características especificadas en el método.

h. Contenido de Cloruro:

Criterio de Aceptación: no menos de 16.9 % y no más de 17.6% de Cl⁻, calculado en base seca.

Se tomaron dos muestras de un lote de la Sustancia de Referencia evaluada. Se pesaron aproximadamente 500 mg y se disolvieron en 50 mL de metanol. Se añadieron 5 mL de ácido acético glacial, 2 a 3 gotas de eosina Y SR. Las muestras se valoraron con nitrato de plata 0.1 N SV.

TABLA N° 7. Valores del Contenido de Cloruro de Clorhidrato de Piridoxina de la Sustancia de Referencia Secundaria.

Sustancia de Referencia	N° de Muestra	Volumen de Titulante (mL)	Peso de la Muestra (mg)	Cantidad de Cl ⁻ (mg)	%
Secundaria	1	24.4	500.2	86.49	17.29
	2	24.6	500.1	87.20	17.43
\bar{X}		24.5	500.15	86.85	17.36

El promedio de las dos muestras es de 17.36 % por lo cual se concluye que la muestra sí cumple pues el contenido de Cl⁻ está dentro del rango de los Criterios de Aceptación.

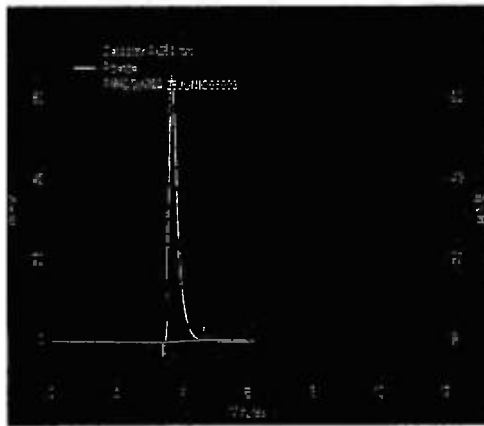
i. **Valoración o Ensayo:**

Criterios de Aceptación: Debe cumplir con la Definición de Potencia: no debe contener menos de 98.0 % ni más de 102.0 % de $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$, calculado en base seca.

Se realizaron cinco inyecciones de 20 μL separadas para la Sustancia de Referencia USP y tres para la Sustancia de Referencia analizada. El detector de arreglo de Diodos del Cromatógrafo líquido se estableció a 281 nm, longitud de onda de máxima absorción.

GRÁFICA N° 8. Cromatograma de HPLC para las Sustancias de Referencia de Clorhidrato de Piridoxina.

Sustancia de Referencia USP



Sustancia de Referencia Secundaria

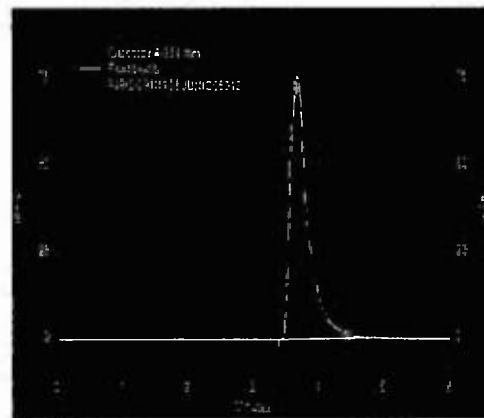


TABLA N° 8. Valores de la Absorbancia de Clorhidrato de Piridoxina de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Secundaria.

N° de Muestra	Sustancia de Referencia					
	USP		Secundaria			
	Tiempo de Retención (min)	Área del pico	Tiempo de Retención (min)	Área del pico	Cantidad de $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	% de Recuperación
1	3.669	1208221	3.659	1413059	58.69	116.92
2	3.669	1206627	3.648	1389236	57.70	114.94
3	3.680	1197437	3.659	1393012	57.85	115.24
4	3.680	1218282				
5	3.669	1208545				
\bar{X}	3.673	1207822	3.655	1398436	58.08	115.7
SD	0.006	7406	0.006	12804	0.53	1.07
CV	0.16 %	0.61 %	0.16 %	0.91 %	0.92 %	0.92 %

A través de la fórmula $1000 C (R_U / R_S)$, se obtuvieron las cantidades de $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ en las muestras de la Sustancia de Referencia de Clorhidrato de Piridoxina analizada, lo que representa un promedio de pureza de 115.7 %.

Para la valoración de la base seca se debe restar el valor de la Pérdida por Secado, 0.81 %, de Residuo por Ignición y el Contenido de Cloruro 17.36 % obteniendo un valor de 97.43 %, por lo que la muestra no cumple con el Criterio de Aceptación de esta prueba pues está fuera del rango de 98 % - 102 % establecido en la Definición de Potencia.

Esta prueba se realizó sin la utilización de la solución del Estándar Interno, el ácido p-hidroxibenzóico, pues no estaba disponible.

3. CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL.

a. Muestras evaluadas y características sensoriales:

Se evaluó un solo lote (envase) de la Sustancia de Referencia Secundaria.

Posee entre sus características ser un polvo blanco, cristalino, inodoro. El recipiente que contenía la muestra era de vidrio de color ámbar. En su exterior presentaba una etiqueta que mostraba el nombre, número de lote, fecha de expiración, potencia y el código interno.

b. Sustancia de Referencia USP: Clorhidrato de Propranolol ER USP.

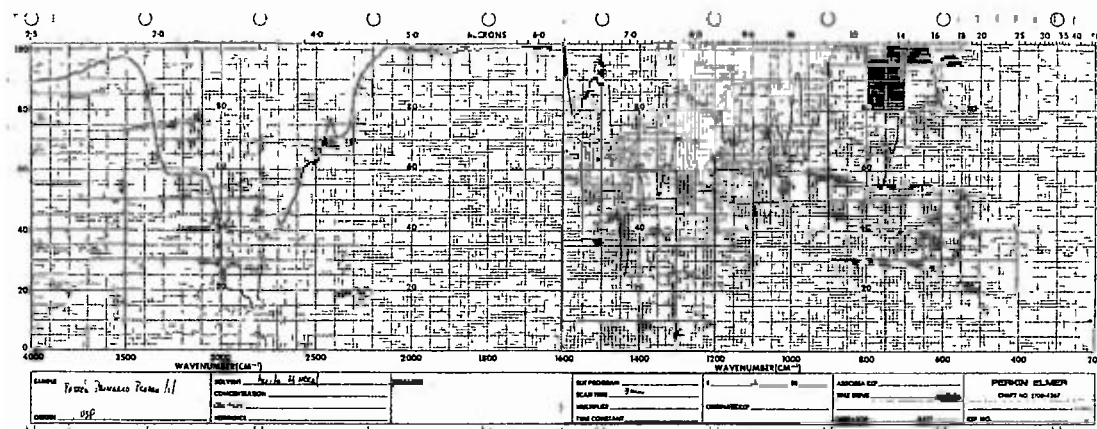
Se encontraba en un recipiente de vidrio de color ámbar. Antes de ser utilizado para su evaluación se secó a 105 °C por 4 horas. Se mantuvo todo el tiempo en un envase herméticamente cerrado.

c. Identificación: Se realizaron las tres pruebas presentadas en la monografía de materia prima de Clorhidrato de Propranolol.

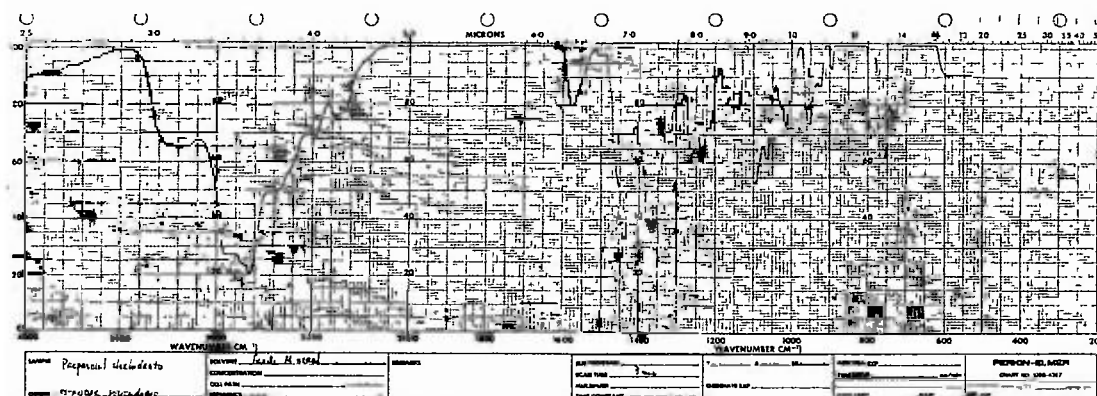
A: Absorción Infrarroja (IR):

Tanto la Sustancia de Referencia evaluada como la Sustancia de Referencia USP se trituraron finamente y se dispersaron en dos gotas de aceite mineral. Los espectros de absorción IR de la Sustancia de Referencia evaluada y de la Sustancia de Referencia USP fueron idénticos.

GRÁFICA N° 9. Espectro de Absorción IR de Clorhidrato de Propranolol (Sustancia de Referencia USP).



GRÁFICA N° 10. Espectro de Absorción IR de Clorhidrato de Propranolol (Sustancia de Referencia Secundaria).



B: El tiempo de retención del pico principal de Propranolol en el cromatograma de la Preparación de Valoración corresponde con el del cromatograma de la Preparación Estándar. Como se observa en la Tabla N° 11, en la sección del ensayo o valoración, la Sustancia de Referencia USP presentó un tiempo de retención promedio de 5.363 min y las tres muestras de la Sustancia de Referencia Secundaria presentaron tiempos de

retención promedios de 5.129 min, 5.001 min y 4.923 min. Los tiempos de retención no son similares, sin embargo la forma del pico y el espectro UV (no se muestra) coinciden. La diferencia en el tiempo de retención puede deberse a equilibrio de la fase móvil.

C: Responde a las pruebas para Cloruro:

Criterio de Aceptación: el precipitado desaparece luego de la adición de Amonia TS.

Se pesó 16.7 mg de la Sustancia de Referencia y 16.8 mg de la Sustancia de Referencia USP correspondientes a 2 mg de Cl^- . Se pasó a un tubo de ensayo, se le agregó agua y se colocó en un sonicador por 4 minutos. Luego se le agregan los otros reactivos ácido nítrico diluido y nitrato de plata TS, con el cual se produjo un precipitado blanco. Se procede a centrifugar y se decanta el agua. Cuando se adiciona Amonia TS, desaparece el precipitado.

Por lo que se concluye que la muestra cumple con el Criterio de Aceptación ya que responde a las pruebas de cloruro.

d. Intervalo de fusión:

Criterio de Aceptación: entre 162 °C y 165 °C.

Se evaluó una muestra del Estándar de Punto de Fusión (Fenacetina N° 5 WHO), la Sustancia de Referencia Secundaria y para soluciones para soluciones la Sustancia de Referencia USP, llenando cada capilar de vidrio con suficiente cantidad del polvo seco para formar una columna en el fondo

del tubo. Luego de insertar cada tubo capilar en el medio, se toman las lecturas con la ayuda del termómetro del baño. Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 9. Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Clorhidrato de Propranolol.

Sustancia	Punto de Fusión
Estándar Interno (p.f.=135 °C)	134-136 °C
Referencia USP	161-162 °C
Referencia Secundaria	162 °C

La muestra de la Sustancia de Referencia Secundaria cumple, por tener un punto de fusión dentro del rango 162° y 165°.

e. Rotación específica:

Criterio de Aceptación: entre -1.0° y $+1.0^\circ$.

Se pesó 100.5 mg de la Sustancia de Referencia evaluada y se disolvió en 25 mL de agua obteniendo una concentración 4.02 mg/mL. Utilizando el polarímetro apropiado se obtuvieron las siguientes lecturas que se repitieron cuatro veces.

TABLA N° 10. Valores de la Rotación Específica de la muestra de Sustancia de Referencia Secundaria de Clorhidrato de Propranolol.

Giro \ Lecturas	Lecturas				\bar{X}	SD
	1	2	3	4		
Dextrógiros (+)	0.50	0.70	0.70	0.75	0.66	0.11
Levógiros (-)	0.25	0.35	0.35	0.25	0.30	0.057

Las muestras evaluadas cumplen con esta prueba ya que las lecturas de rotación óptica están dentro del rango + 1.0 y – 1.0.

f. Pérdida por secado:

Criterio de Aceptación: no pierde más de 0.5 % de su peso.

Se pesó 0.2661 g de la Sustancia de Referencia Secundaria de Clorhidrato de Propranolol y se colocó en un vaso químico para introducirlo en el horno a 105 °C por 4 horas. Luego de este período de secado se obtuvo un peso de 0.2648 g, lo que representa un 0.4885 %, por lo que cumple con el Criterio de Aceptación al ser menor de 0.5 % de su peso.

g. Residuo por ignición:

Criterio de Aceptación: no más de 0.1 %.

La muestra analizada presentó un residuo de 0.62 %, el cual es superior al establecido por el Criterio de Aceptación.

h. Impurezas Orgánicas Volátiles.

Criterio de Aceptación: cumple con los requisitos.

Esta prueba no se realizó pues no se contaba con el equipo con las características especificadas en el método.

i. Valoración o Ensayo:

Criterio de Aceptación: debe cumplir con la Definición de Potencia: no debe contener menos de 98.0 % ni más de 101.5 % de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$, calculado en base seca.

Se realizaron 6 inyecciones para 3 muestras de la Sustancia de Referencia evaluadas y una muestra de la Sustancia de Referencia USP.

GRÁFICA N° 11. Cromatogramas de HPLC de Clorhidrato de Propranolol.

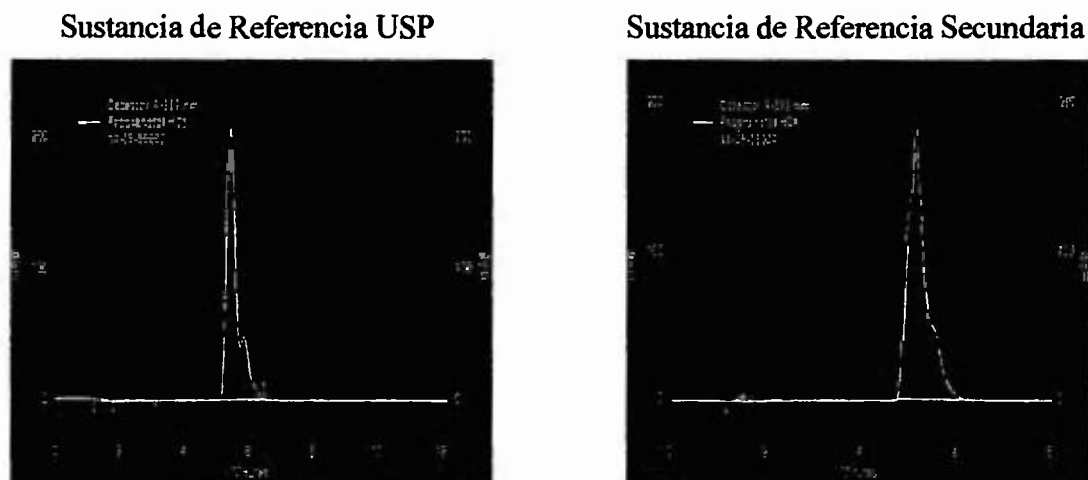


TABLA N° 11. Datos obtenidos en la valoración de Clorhidrato de Propranolol de las Sustancias de Referencia USP y de la Sustancias de Referencia Evaluada.

N° de Muestra	Sustancia de Referencia							
	USP		Secundaria					
			1		2		3	
	t de retención (min)	Área del pico	t de retención (min)	Área del pico	t de retención (min)	Área del pico	t de retención (min)	Área del pico
1	5.440	3884201	5.184	4868348	5.045	4899914	4.949	4836242
2	5.658	4777135	5.173	4835584	5.024	4917282	4.949	4921919
3	5.323	5467130	5.120	4862683	5.013	4913351	4.939	4911267
4	5.312	5434058	-----	-----	4.992	4849179	4.917	4911894
5	5.248	5425016	5.099	4864870	4.960	4894508	4.896	4907049
6	5.195	5381238	5.067	4875797	4.971	4911854	4.885	4916689
Σ	32.176	30368778	25.643	24307282	30.005	29386088	29.535	29405060
\bar{X}	5.363	5061463	5.129	4861456	5.001	4897681	4.923	4900843
DS	0.166	633184	0.049	15294	0.032	25291	0.028	32056
CV	3.09 %	12.51 %	0.95 %	0.31 %	0.63 %	0.51 %	0.56 %	0.65 %

La diferencia entre los tiempos de retención es debida al equilibrio de la columna, sin embargo podemos decir que se establece la identidad debido a

que el espectro UV de ambos picos coincide (espectro no se muestra).

No se contó con el clorhidrato de procainamida para realizar la Solución de Resolución.

Reemplazando en la fórmula $250 C (r_u/r_s)$, obtenemos 48.27 mg de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ en la porción de Clorhidrato de Propranolol, que representa un 96.55 % de pureza. Para el cálculo de la base seca se debe restar el valor de Pérdida por Secado, 0.62 % y de Residuo por Ignición 0.4885 % obteniendo un valor de 95.44 %, no cumpliendo con el Criterio de Aceptación correspondiente a la Definición de Potencia por estar fuera del rango de 98.0 % - 101.5%.

4. CLORHIDRATO DE RANITIDINA.

a. Muestras evaluadas y características sensoriales:

Se evaluó un solo lote de la Sustancia de Referencia Secundaria. El recipiente que contenía la muestra era de vidrio de color ámbar. En su exterior presentaba una etiqueta que mostraba el nombre, número de lote, fecha de expiración y potencia.

Esta Sustancia de Referencia posee entre sus características ser un polvo cristalino e inodoro, anaranjado-amarillo pálido. La presencia de una coloración un poco anaranjado puede significar un signo de descomposición.

b. Sustancia de Referencia USP: Clorhidrato de Ranitidina ER USP. Compuesto Relacionado A de Ranitidina ER USP, Compuesto Relacionado B de Ranitidina ER USP, Compuesto Relacionado C de Ranitidina ER USP.

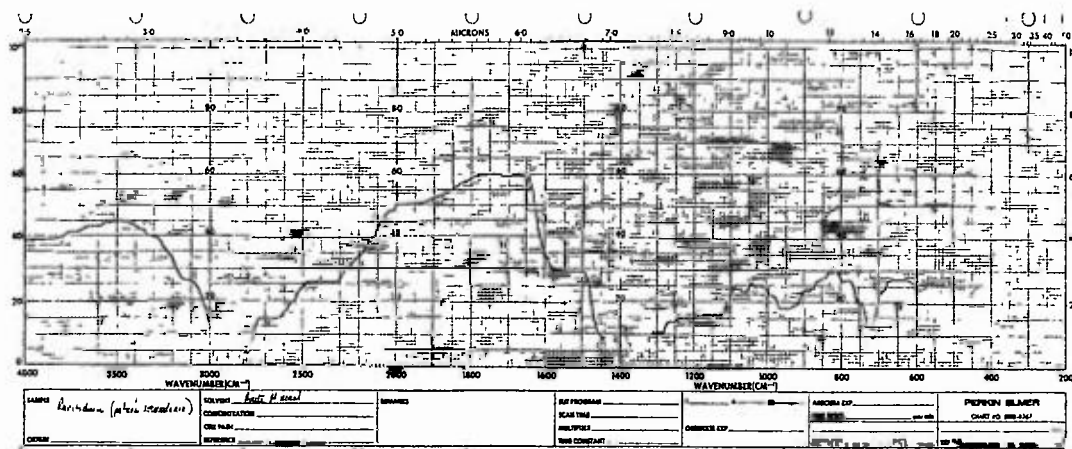
El Clorhidrato de Ranitidina ER USP se colocó al vacío a 60 °C por 3 horas antes de ser usado. Se mantiene en un envase herméticamente cerrado y protegido de la luz por el material de vidrio de color ámbar. El único envase de la Sustancia de Referencia USP con el que se contaba, se descompuso en el transcurso de las evaluaciones por lo que sólo se pudieron realizar algunas pruebas que requerían la comparación con esta Sustancia de Referencia USP.

- c. **Identificación:** Se realizaron las tres pruebas presentadas en la monografía de materia prima de Clorhidrato de Ranitidina.

A: Absorción Infrarroja (IR):

La Sustancia de Referencia se trituró finamente y se dispersó en dos gotas de aceite mineral. Se obtuvo el espectro IR de la Sustancia de Referencia pero no se pudo comparar contra el espectro de la Sustancia de Referencia USP pues estaba descompuesto.

GRÁFICA N° 12. Espectro de Absorción IR de Clorhidrato de Ranitidina (Sustancia de Referencia Secundaria).



B: Absorción Ultravioleta (UV):

Criterio de Aceptación: La absorptividad a 229 nm y 315 nm, calculadas en base seca, no difieren en más de 3.0 %.

Por ser un material fotosensible, se requirió de la utilización de volumétricos ámbar tanto para las tres muestras de la Sustancia de Referencia Secundaria como para la muestra de la Sustancia de Referencia USP.

GRÁFICA N° 13. Espectro de Absorción UV de las Sustancias de Referencia de Clorhidrato de Ranitidina.

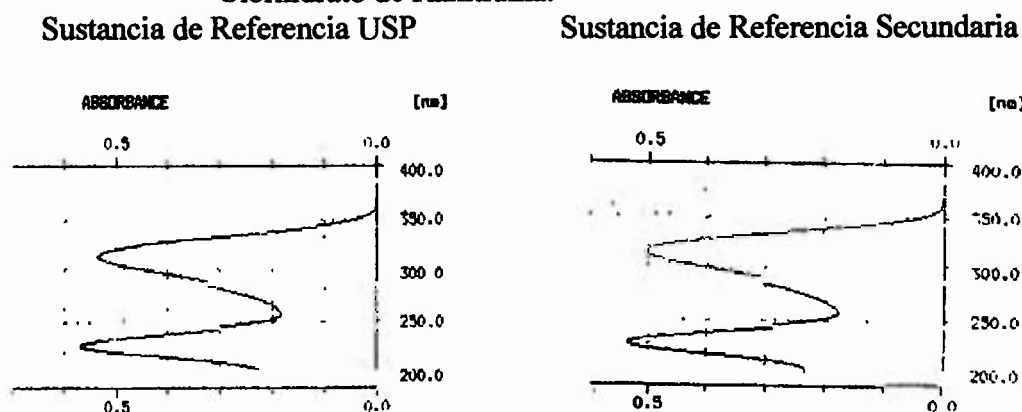


TABLA N° 12. Valores de Absorción UV del Clorhidrato de Ranitidina de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Secundaria.

Sustancia de Referencia	N° de Muestra	Concentración (µg/mL)	228 nm			314 nm		
			Absorbancia (A)	Absortividad o Razones de Absortividad	% de Absortividad	Absorbancia (A)	Absortividad o Razones de Absortividad	% de Absortividad
USP	1	112	0.570	5.09		0.536	4.79	
Secundaria	1	119	0.538	4.52	11.20	0.503	4.23	11.69
	2	119	0.536	4.50	11.59	0.504	4.24	11.48
	3	119	0.534	4.49	11.79	0.503	4.23	11.69
\bar{X}			0.536	4.50	11.53	0.503	4.23	11.62
SD			0.002	0.015	0.30	0.001	0.006	0.12
CV			0.37 %	0.333 %	2.6 %	0.19 %	0.14 %	1.03 %

La diferencia promedio entre las absorptividades a 228 nm y 314 nm es de 0.09 % por lo que es menor a 3 % como lo establece el Criterio de Aceptación.

C: Una solución de esta sustancia cumple con los requisitos de la prueba para Cloruro:

Criterio de Aceptación: el precipitado desaparece luego de la adición de Amonia TS.

Se pesaron 19.8 mg de la Sustancia de Referencia evaluada y 19.9 mg de la Sustancia de Referencia USP correspondientes a 2 mg de Cl.

Se pasó el material a un tubo de ensayo en donde se le agregó agua y se puso a sonicar por 4 minutos. Se agregaron los reactivos: ácido nítrico diluido y nitrato de plata TS, luego de lo cual se produjo un precipitado blanco. Se centrifuga, se decanta el agua y luego se adiciona amonia TS, lo que hace que desaparezca el precipitado blanco.

Esto significa que la muestra cumple con el Criterio de Aceptación para la determinación de la presencia de cloruro.

d. pH:

Criterio de Aceptación: entre 4.5 y 6.0.

Se realizaron dos lecturas de la Sustancia de Referencia evaluada que presentaron pH de 5.94 y 5.83 con un promedio de 5.9, valores que se encuentran dentro del rango 4.5 – 6.0, por lo cual la muestra cumple con dicha prueba.

e. Pérdida por secado:

Criterio de Aceptación: no pierde más de 0.75 % de su peso.

Se pesaron 0.9935 g de la Sustancia de Referencia Secundaria. Se colocó en un vaso químico y se introduce en el horno a una temperatura de 60 °C por 3 horas. El peso seco de la sustancia fue de 0.9940 g. Por lo cual se concluye que la muestra cumple con la prueba ya que se obtiene una pérdida de 0.0503 %, el cuál es menor de 0.75 % de su peso, como lo establece el Criterio de Aceptación.

f. Residuo por ignición:

Criterio de Aceptación: no más de 0.1 %.

Se obtuvo un 0.13 % del residuo por ignición de la Sustancia de Referencia Secundaria. Por lo que no cumple con el Criterio de Aceptación que establece que no debe ser mayor a 0.1 %.

g. Pureza Cromatográfica:

Criterio de Aceptación: los requerimientos de aptitud del sistema se cumplen si hay una resolución completa entre las manchas primarias en el cromatograma de la Solución de Prueba y la Solución de Resolución combinadas y si una mancha es observada en el cromatograma de la Solución Estándar D. Cualquier mancha observada en el cromatograma de la Solución de Prueba con el valor R_f correspondiente al de la mancha principal producida por la Solución para Identificación, no debe ser mayor en tamaño o intensidad que la mancha principal obtenida de la Solución Estándar B

correspondiente a no más de 0.5%; y ninguna otra mancha en el cromatograma de la Solución de Prueba excede en tamaño o intensidad a la mancha principal obtenida de la Solución Estándar C (0.3%). La suma de las intensidades de todas las manchas obtenidas a partir de la Solución de Prueba no debe corresponder a más de 1.0%.

No se realizó pues las dos Sustancias de Referencia (Secundaria y USP) estaban degradadas.

h. Impurezas Orgánicas Volátiles.

Criterio de Aceptación: cumple con los requisitos.

No se realizó esta prueba porque tanto la Sustancia de Referencia Secundaria como la de USP estaban degradadas.

i. Valoración o Ensayo:

Criterio de Aceptación: debe cumplir con la Definición de Potencia: no debe contener menos de 97.5 % ni más de 102.0 % de $C_{13}H_{22}N_4O_3S \cdot HCl$, calculado en base seca.

No se realizó por degradación de la Sustancia de Referencia Secundaria y la USP.

5. CLORHIDRATO DE VERAPAMILO.

a. Muestras analizadas y características sensoriales:

Se contaba con dos lotes de la Sustancia de Referencia Secundaria (A y B) por lo cual se tomó la decisión de analizar ambas muestras.

Sus características fueron aceptables pues su apariencia era un polvo blanco, cristalino, inodoro. Los recipientes que contenían las muestras eran de vidrio de color ámbar. En su exterior presentaba una etiqueta que mostraba el nombre, número de lote, cantidad y código del fabricante.

- b. **Sustancia de Referencia USP:** Clorhidrato de Verapamilo ER USP. Compuesto Relacionado B de Verapamilo ER USP.

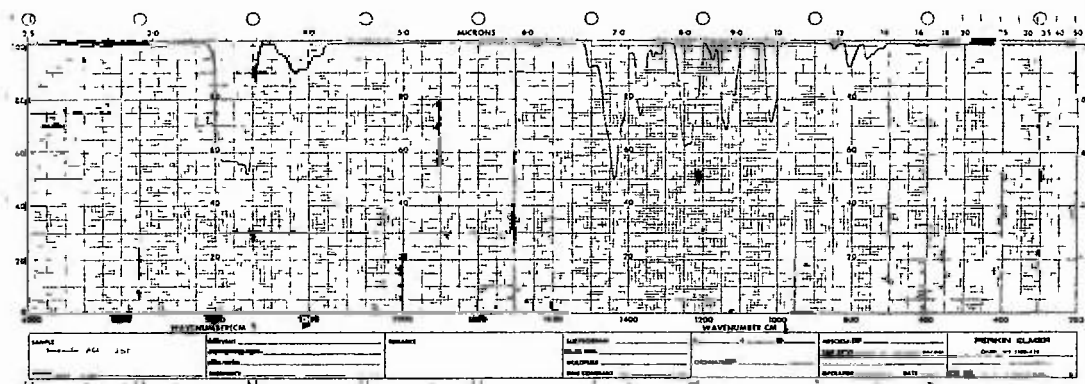
El Clorhidrato de Verapamilo ER USP se encontraba en un recipiente de vidrio de color ámbar y se secó a 105 °C por 2 horas antes de ser usado. Se mantiene el contenido en envases herméticamente cerrado y protegido de la luz.

- c. **Identificación:** Se realizaron las dos pruebas alternas presentadas en la monografía de materia prima de Clorhidrato de Verapamilo.

A: Absorción Infrarroja (IR):

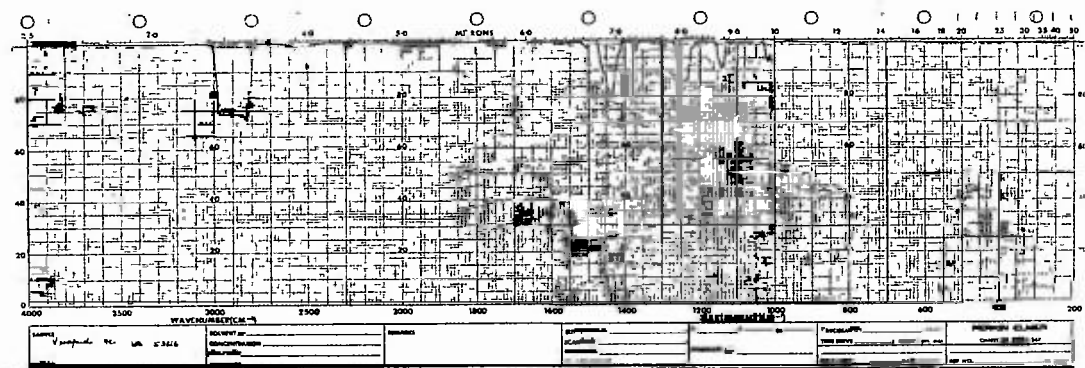
Tanto los lotes A y B de las Sustancias de Referencia como la de Referencia USP se trituraron finamente y se dispersaron dos gotas de aceite mineral en lugar de bromuro de potasio, como lo establece la monografía, pues no se cuenta con la prensa para la preparación de la pastilla. Los espectros IR tanto para el lote A y B de la Sustancia de Referencia como para la de Referencia USP fueron similares. Sin embargo, en el Secundario faltó un poco más de muestra.

GRÁFICA N° 14. Espectro de Absorción IR de Clorhidrato de Verapamilo (Sustancia de Referencia USP).

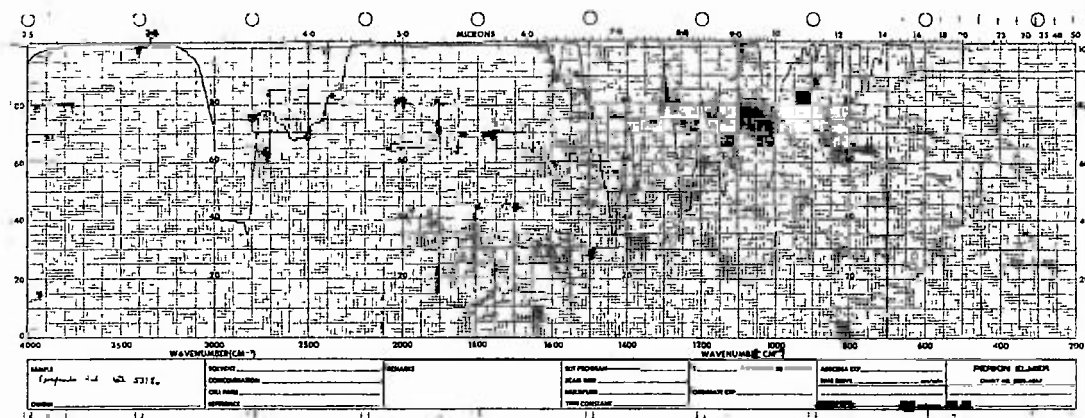


GRÁFICA N° 15. Espectros de Absorción IR de Clorhidrato de Verapamilo (Sustancias de Referencia Secundaria).

Lote A



Lote B



B: Criterio de Aceptación: El tiempo de retención del pico principal para Verapamilo en el cromatograma de la Preparación Prueba corresponde con el cromatograma de la Preparación Estándar B, según se obtiene en la prueba de pureza cromatográfica.

Se tomó el resultado obtenido en la prueba de pureza cromatográfica en la Preparación de Referencia USP B a una concentración de 9.4 µg por mL y su tiempo de retención fue de 12.399 min.

Las Sustancias de Referencia de Clorhidrato de Verapamilo A y B, presentaron el pico principal a un tiempo de retención de 13.056 min y 12.209 min, respectivamente, cumpliendo con el Criterio de Aceptación de la prueba, como se puede ver en la Tabla No. 14.

C: Responde a las pruebas para Cloruro:

Criterio de Aceptación: el precipitado desaparece luego de la adición de Amonia TS.

Se pesaron de la Sustancia de Referencia Secundaria, 27.2 mg y 27.4 mg del lote A y B, respectivamente, correspondientes a 2 mg de Cl⁻. Se colocaron en ambos tubos de ensayo, en donde se les agregaron 2.0 mL de agua y se sonicaron por 4 minutos. Se agregaron los otros reactivos como ácido nítrico diluido y nitrato de plata TS, luego de lo cual se produjo un precipitado blanco. Se centrifugaron en los tubos y se decantó el agua. Se adicionó Amonia TS y desapareció el precipitado blanco.

Por lo que se concluye que las muestras cumplen con el Criterio de Aceptación. La monografía no especifica la prueba de cloruro seco.

d. Intervalo de fusión:

Criterio de Aceptación: entre 140° y 144° C.

Se evaluó una muestra del Estándar de Punto de Fusión (Fenacetina N° 5 WHO), las Sustancias de Referencia evaluadas de los lotes A y B y la Sustancia de Referencia USP, llenando el capilar de vidrio, con suficiente cantidad de polvo seco para formar una columna en el fondo del tubo. Luego de insertar cada tubo capilar en el medio, se toman las lecturas con la ayuda del termómetro del baño. Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 13. Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Clorhidrato de Verapamilo.

Sustancia	Punto de Fusión	
	Lote A	Lote B
Estándar Interno (p.f.=135 °C)	134-135 °C	135-136 °C
Referencia USP	141-143 °C	142-144 °C
Referencia Secundaria	141-143 °C	143-144 °C

Se concluye que ambos lotes de las Sustancias de Referencia Secundaria están dentro del rango de aceptación de 140° y 144° C.

e. pH:

Criterio de Aceptación: entre 4.5 y 6.5.

Se tomaron dos lecturas de pH para cada lote (A y B). El valor promedio para ambos lotes fue de 4.5 por lo que están dentro del rango del Criterio de Aceptación.

f. Pérdida por secado:

Criterio de Aceptación: no pierde más de 0.5 % de su peso.

Una porción de ambos lotes de las Sustancias de Referencia A y B, se mantuvieron por dos horas a 105 °C. En ambos casos no se obtuvo pérdida por secado por lo cual ambos lotes recuperados en un 100 %, cumplen con el Criterio de Aceptación de este ensayo.

g. Residuo por ignición:

Criterio de Aceptación: no más de 0.1 %.

Se obtuvo para el lote A un residuo de 0.06 % de la ignición de la Sustancia de Referencia y para el lote B fue de 0.07 % de residuo por ignición.

Por lo que ambos lotes cumplen con esta prueba por presentar residuos menores a 0.1 %.

h. Pureza Cromatográfica:

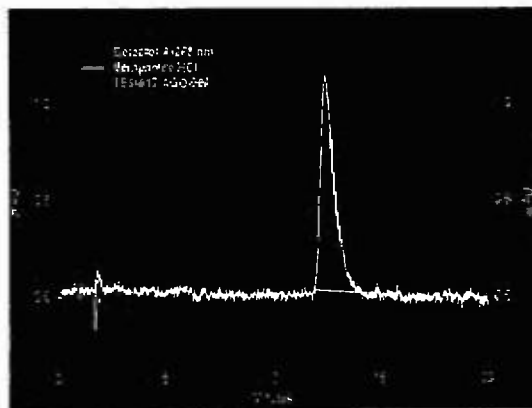
Criterio de Aceptación: 1) La suma de las respuestas de los picos, a excepción de la de Verapamilo, obtenidas a partir de la Preparación Prueba, no es mayor que la respuesta del pico de Verapamilo obtenida de la Preparación de Referencia USP B (0.5 %) y ninguna respuesta de un pico individual es mayor que la respuesta del pico de Verapamilo obtenida a partir de la Preparación Estándar A (0.3 %).

2) Como lo establece el procedimiento, se realizaron cinco inyecciones de 20 µL tanto de las Sustancias de Referencia de los lotes A y B como de la

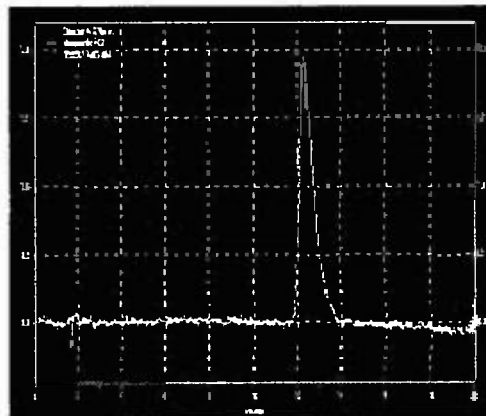
Sustancia de Referencia USP A y B, con concentraciones de 5.6 y 9.4 μg por mL, respectivamente. Á continuación una ilustración de los cromatogramas:

GRÁFICA N° 16. Cromatogramas representativos de Clorhidrato de Verapamilo.

Sustancia de Referencia USP 5.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$

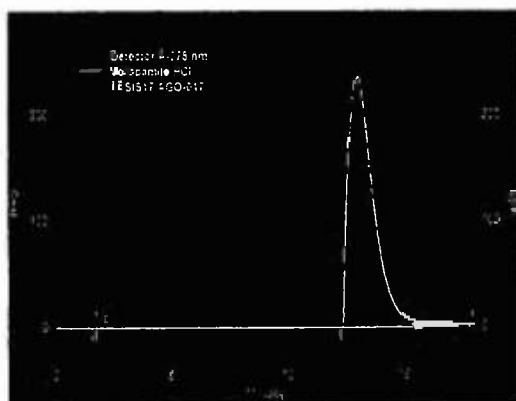


Sustancia de Referencia USP 9.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

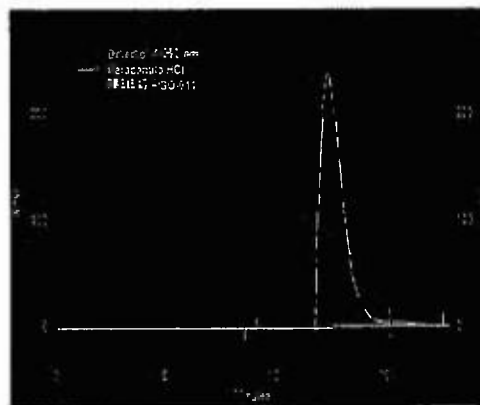


Sustancia de Referencia Secundaria (2.0 máximas mg/mL).

Lote A



Lote B



Ninguno de los cromatogramas presentó otro pico que no fuera el del Clorhidrato de Verapamilo.

Los resultados en base a los tiempos de retención obtenidos a 278 nm se presentan en la siguiente tabla.

TABLA N° 14. Tiempos de Retención de la Valoración de Clorhidrato de Verapamilo de la Preparación de la Sustancia de Referencia USP y de la Sustancia de Referencia Secundaria.

Sustancia de Referencia	USP				Secundaria			
	(A)		(B)		Lote A		Lote B	
Concentraciones	5.6 µg/mL		9.4 µg/mL		(2.0 mg/mL)			
N° de Muestra	t de retención (min)	Área del pico	t de retención (min)	Área del pico	t de retención (min)	Área del pico	t de retención (min)	Área del pico
1	12.597	60542	12.256	89708	13.003	17625463	12.501	16384087
2	12.427	57901	12.672	92702	12.971	17321471	12.277	17864647
3	12.683	57231	12.459	91832	13.227	17216556	12.096	17835749
4	12.533	56174	12.309	87940	13.141	17438502	11.989	17455152
5	12.448	61348	12.299	88760	12.939	17466088	12.181	17451106
Σ	62.688	293196	61.995	450942	65.281	87068080	61.044	86990741
\bar{X}	12.538	58639	12.399	90188	13.056	17413616	12.209	17398148
SD	0.106	2212	0.171	2022	0.123	154576	0.195	600727
CV	0.084 %	3.77 %	1.37 %	2.24 %	0.94 %	0.88 %	1.59 %	3.45 %

La prueba para el lote B muestra un tiempo de retención promedio cercano al de la Sustancia de Referencia USP en ambas concentraciones. En el caso del lote A, la diferencia entre los tiempos de retención puede deberse al tiempo requerido para que la columna utilizada se equilibrara y también a la concentración que es muy alta.

h. Impurezas Orgánicas Volátiles:

Criterio de Aceptación: cumple con los requisitos.

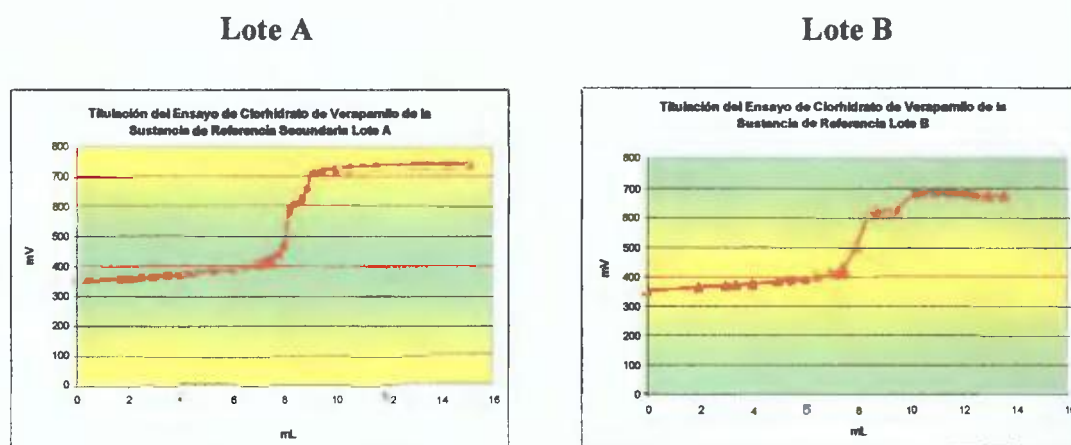
Esta prueba no se realizó ya que no se contaba con un cromatógrafo de gases.

i. Valoración o Ensayo:

Criterio de Aceptación: Dentro del rango de la Definición de Potencia: no debe contener menos de 98.5 % ni más de 101.0 % de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$, calculado en base seca.

En la titulación no acuosa para el lote A se consumió 8.44 mL del titulante, lo que corresponde a 414.49 mg y para el lote B se consumió 8.46 mL del titulante, que corresponde a 415.47 mg de Clorhidrato de Verapamilo. En la Gráfica N° 17 se pueden apreciar las curvas de titulación potenciométricas de las muestras (Lotes A y B).

GRÁFICA N° 17. Curva de Titulación No Acuosa de Clorhidrato de Verapamilo en los lotes de la Sustancia de Referencia Secundaria.



Por lo que los % de recuperación para el lote A es de 103.57 % y para el lote B es de 103.71 % de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$. Para ambas purezas se les debe restar el Residuo por Ignición 0.06 % y 0.07% del lote A y B, respectivamente, que corresponde a 103.51 % y 103.64 % calculado en base seca valor por arriba de la Definición de Potencia que establece que debe estar entre 99.0 % - 100.5 %,

6. TRIMETOPRIM.

a. Muestras evaluadas y características sensoriales:

Se evaluó un solo lote de la Sustancia de Referencia Secundaria. Esta

posee, entre sus características, ser un polvo cristalino blanco e inodoro, tal como está establecido en la bibliografía consultada.

El recipiente que contiene la muestra es de vidrio de color ámbar. En su exterior presenta una etiqueta que mostraba el nombre, número de lote, fecha de expiración y código interno del Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos que lo proporcionó.

b. Sustancia de Referencia USP: Trimetoprim ER USP.

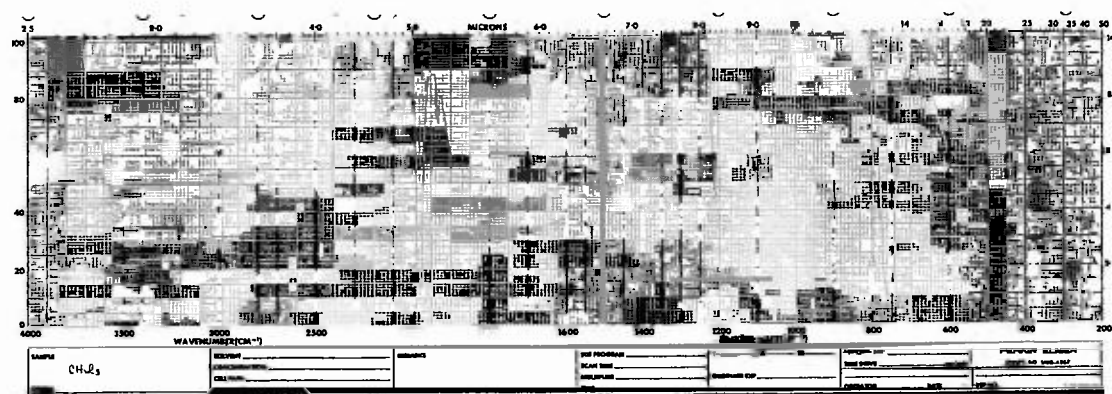
Se encontraba bien cerrado en un recipiente de vidrio de color ámbar en un desecador. Antes de su utilización la porción debe secarse en vacío sobre sílica gel por 4 horas, luego debe mantenerse en un envase herméticamente cerrado y protegido de la luz.

c. Identificación: Se realizaron las dos pruebas presentadas en la monografía de materia prima de Trimetoprim.

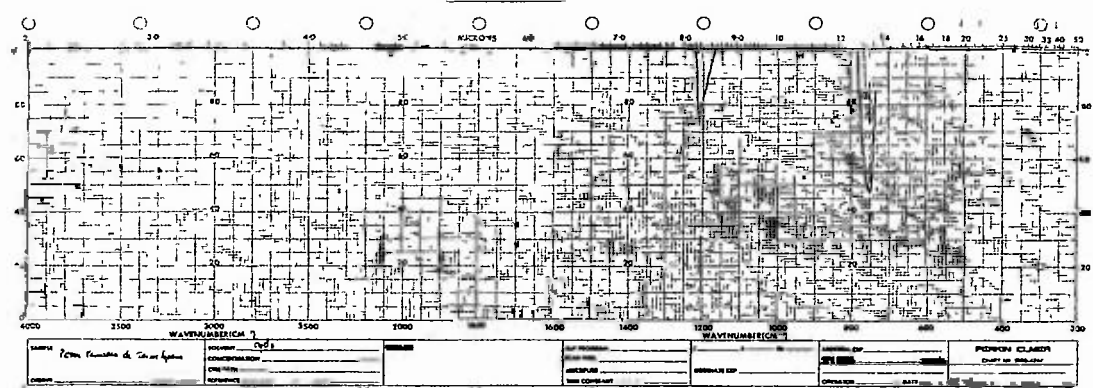
A: Absorción Infrarroja (IR):

La Sustancia de Referencia Secundaria como la Sustancia de Referencia USP se trituraron finamente y las muestras se dispersaron en dos gotas de cloroformo. Se presentaron problemas en la emisión de los espectros IR tanto de la Sustancia de Referencia Secundaria como de la Sustancia de Referencia USP. Al correr un espectro IR del cloroformo, comprobamos que el problema venía de la rápida evaporación solvente por lo que no se pudieron comparar los espectros.

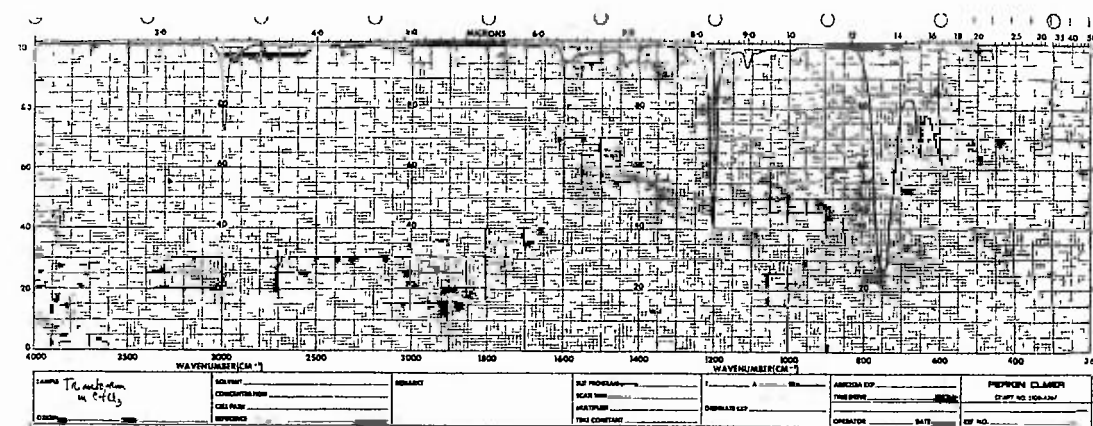
GRÁFICA N° 18. Espectro de Absorción IR de Cloroformo.



GRÁFICA N° 19. Espectro de Absorción IR de Trimetoprim (Sustancia de Referencia USP).



GRÁFICA N° 20. Espectro de Absorción IR de Trimetoprim (Sustancia de Referencia Secundaria).



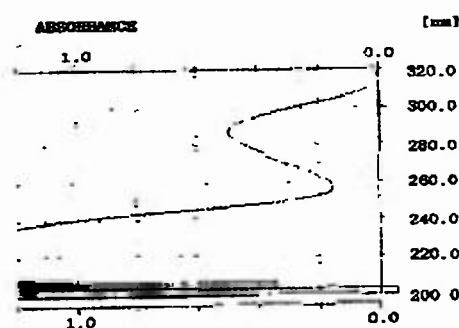
B: Absorción UV:

Criterio de Aceptación: el espectro de absorción UV de esta solución exhibe máximas y mínimos a iguales longitudes de onda que la solución de Trimetoprim ER USP, medidos conjuntamente; y las absorptividades respectivas, calculadas en base seca solamente para la muestras prueba a una longitud de onda de máxima absorbancia de cerca de 287 nm, no debe diferir por más de 3.0 %.

Se prepararon tres muestras de la Sustancia de Referencia estudiada y una de la Sustancia de Referencia USP, a una concentración de 20 µg por mL utilizando un espectrofotómetro, en el rango de 200 y 400 nm. Se registraron los espectros de absorción UV y se obtuvo una longitud de onda máxima de 287.7 nm. Las absorptividades y/o razones de absorbancias, se presentan en la Tabla N° 15.

GRÁFICA N° 21. Espectros de Absorción UV de Trimetoprim.

Sustancia de Referencia USP.



Sustancia de Referencia Secundaria.

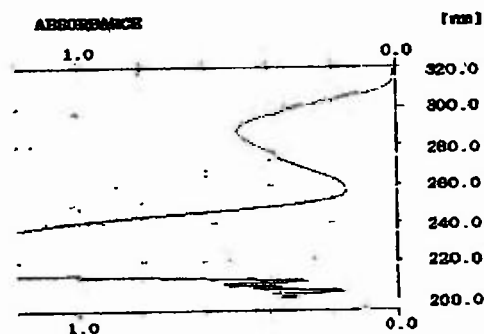


TABLA N° 15. Resultados de la Prueba de Identificación por Espectrofotometría UV de la Sustancia de Referencia USP y Sustancia de Referencia Secundaria de Trimetoprim.

Sustancia de Referencia	USP	Secundaria			\bar{X}	SD	CV
N° de Muestra	1	1	2	3			
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	20.0	20.22	20.1	20.0	20.11	0.11	0.005
Absorbancias (A)	0.497	0.512	0.508	0.503	0.508	0.005	0.009
Absortividad o Razones de Absorbancias	24.85	25.32	25.27	25.15	25.25	0.087	0.003
% de Absortividad		1.89	1.69	1.21	1.60	0.349	0.219

Todas las muestras de la Sustancia de Referencia están dentro de los límites especificados, siendo el promedio de la diferencia en absortividad de 1.60 %, cumpliendo así, con el criterio de aceptación menor de 3 %.

d. Intervalo de fusión:

Criterio de Aceptación: entre 199 °C y 203 °C.

Se realizó una lectura del Estándar de Punto de fusión (Sulfapiridina N° 9 WHO), otra de la Sustancia de Referencia Secundaria y de la Sustancia de Referencia USP. Se llenó, en cada caso, el capilar de vidrio con suficiente cantidad del polvo seco para formar una columna en el fondo del tubo. Luego se insertó cada tubo capilar en el medio y se tomaron las lecturas con la ayuda del termómetro del baño. Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 16. Resultados de la determinación del Rango de Fusión de Trimetoprim.

Sustancia	Punto de Fusión
Estándar Interno (p.f.=193 °C)	193 °C
Referencia USP	202 °C
Referencia Secundaria	201 °C

El valor de fusión de 201 °C para la Sustancia de Referencia Secundaria se encuentra dentro del rango de 199 °C y 203 °C, por lo que cumple dicha prueba.

e. Pérdida por secado:

Criterio de Aceptación: no pierde más de 0.5 % de su peso.

Se pesaron 0.3497 g de la Sustancia de Referencia Secundaria y se colocó en un vaso para introducirlo en el horno a 105 °C por 4 horas y se obtuvo un peso seco de 0.3496 g. Por lo que la pérdida por secado es de 0.0286 %. Por ser menor a 0.5 % de su peso inicial, el lote cumple con esta prueba.

f. Residuo por ignición.

Criterio de Aceptación: no más de 0.1 %.

Se obtuvo un 0.062 % del residuo por ignición de la Sustancia de Referencia Secundaria, por lo cual cumple con el Criterio de Aceptación ya que es menor a 0.1 %.

g. Pureza cromatográfica:

Criterio de Aceptación: no se debe encontrar más de 0.1 % de cualquier impureza individual, ni más de 0.2 % del total de las impurezas.

Esta prueba no se realizó por no contar con la Diaveridina para la Solución de Resolución ni con el Perclorato de Sodio para la solución amortiguadora.

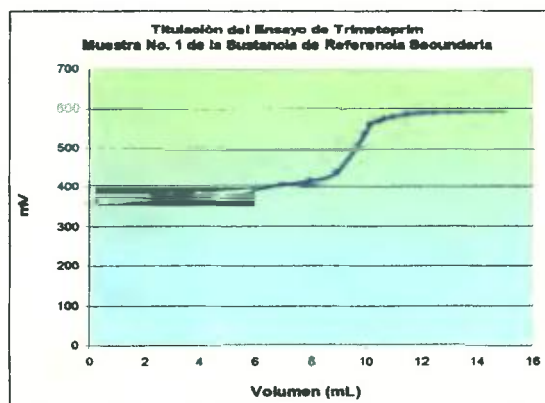
h. Valoración o Ensayo:

Criterio de Aceptación: Dentro del rango de la Definición de Potencia: no debe contener menos de 98.5 % ni más de 101.0 % de $C_{14}H_{18}N_4O_3$, calculado en base seca.

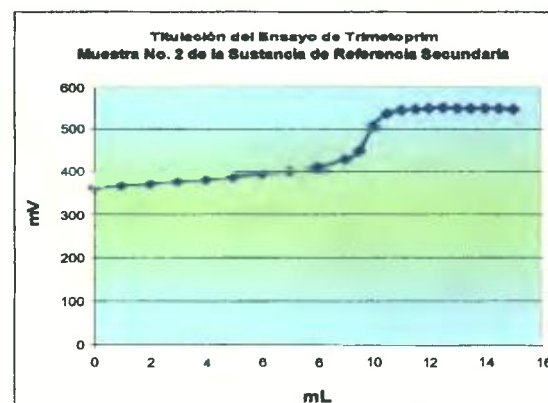
Se tomaron dos muestras, pesando 302.1 mg y 300.0 mg de Trimetoprim, respectivamente. Se añadieron 60 mL de ácido acético glacial y se valoraron con ácido perclórico 0.1N SV. Determinando el punto de final potenciométricamente, se consumieron volúmenes de 9.73 mL y 9.75 mL de Ácido Perclórico 0.1N, respectivamente, los cuales equivalen a 282.46 mg y 283.04 mg de $C_{14}H_{18}N_4O_3$, para cada muestra.

GRÁFICA N° 22. Curva de Titulación (No Acuosa) del Ensayo de Trimetoprim en las dos muestras de la Sustancia de Referencia Secundaria.

(Muestra 1)



(Muestra 2)



Estas cantidades representan un 93.5 % y 94.3 %, respectivamente. El contenido de Trimetoprim promedio en las 2 muestras es de 93.9 % de

$C_{14}H_{18}N_4O_3$, el cual se le resta el valor de Pérdida por Secado 0.0286 % y de Residuo por Ignición 0.062 % que corresponde a 93.81 % calculado en base seca, valor por debajo de la Definición de Potencia que es de 98.5 % - 101.0 %.

B. RESUMEN DE LOS RESULTADOS.

En la Tabla N° 17, presentamos el resumen de todos los resultados de las pruebas realizadas a las Sustancias de Referencia Secundarias evaluadas, especificando las que cumple o no con los Criterios de Aceptación previamente establecidos.

TABLA N° 17. Resumen de los Resultados de las Sustancias de Referencia Secundarias Evaluadas.

Sustancias de Referencia Pruebas	Acetaminofén.	Clorhidrato de Piridoxina	Clorhidrato de Propranolol	Clorhidrato de Ranitidina	Clorhidrato de Verapamilo		Trimetoprim
					Lote A	Lote B	
Descripción	C	C	C	NC	C	C	C
Información de la Etiqueta	inc	inc	inc	inc	inc	inc	inc
Identificación :							
A. IR	C	C	C	sc	C	C	sc
B. UV	C	C	C	C	C	C	C
C.	C	na	C	C	C	C	na
Intervalo de Fusión	C	na	C	na	C	C	C
Agua	NC	na	na	na	na	na	na
Residuo por Ignición	NC	C	NC	NC	C	C	C
Cloruros	C	na	na	na	na	na	na
Sulfatos	C	na	na	na	na	na	na
Sulfuros	C	na	na	na	na	na	na
Metales Pesados	nr	nr	na	na	na	na	na
pH	na	na	na	C	C	C	na
Pérdida por Secado	na	NC	C	C	C	C	C
Rotación Específica	na	na	C	na	na	na	na
p-aminofenol libre	nr	na	na	na	na	na	na
Límite de p-cloroacetanilida	nr	na	na	na	na	na	na
Sustancias fácilmente carbonizables	nr	na	na	na	na	na	na
Impurezas orgánicas volátiles	nr	nr	nr	nr	nr	nr	na
Pureza Cromatográfica	na	na	na	nr	C	C	nr
Contenido de Cloruro	na	C	na	na	na	na	na
Ensayo	NC	NC	NC	nr	NC	NC	NC



C = Cumple
na = No Aplica

NC = No Cumple
nr = No se Realizó

sc = Sin Comparación
inc = Incompleto

C. FORMATO DEL CERTIFICADO DE ANÁLISIS PROPUESTO AL INSTITUTO ESPECIALIZADO DE ANÁLISIS.

Culminada las evaluaciones de las características de la Sustancia de Referencias Secundaria proponemos el siguiente documento que puede ser incorporado en el Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos del I.E.A. Este contiene información del material analizado como de los resultados obtenidos, acompañado de los Criterios de Aceptación que debe cumplir y el respaldo de los analistas que realizan dichas evaluaciones.

	CERTIFICADO DE ANÁLISIS	
	SUSTANCIA DE REFERENCIA REVALORADA:	

Lote:	Fecha de Expiración:	No. de Análisis:
Código:	Fecha de Inicio de Revaloración:	Cuaderno de Análisis:
Fecha de Impresión:	Página:	

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
---------	------------------	------------

Descripción:
 Información de la Etiqueta:
 Identificación:
 A.
 B.
 C.
 Agua:
 Cloruros:
 Contenido de Cloruro:
 Impurezas Orgánicas Volátiles:
 Intervalo de Fusión:
 Límite p-aminofenol:
 Límite p-cloroacetanilida:
 Metales Pesados:
 p-aminofenol libre
 Pérdida por Secado:
 pH:
 Pureza cromatográfica:
 Residuo por Ignición:
 Rotación Específica:
 Sulfatos:
 Sulfuros:
 Sustancias Fácilmente Carbonizables:
 Valoración o Ensayo:

OBSERVACIONES:		
ALMACENAMIENTO:		
SUSTANCIA DE REFERENCIA USP:	Lote:	Exp.
BIBLIOGRAFÍA ANALÍTICA:		

APROBADO

RECHAZADO

Analista de Revaloración:
Fecha:

Autorizado por:
Jefe Dept. de Validación y Desarrollo de Métodos
Fecha:

Campus Universitario Octavio Méndez Pereira - Universidad de Panamá
 Teléfono 269-6494
 Correo Electrónico ieal@ancon.up.ac.pa WEB: <http://www.up.ac.pa>

CONCLUSIONES

Después de realizar la Práctica Profesional y elaborar este informe, puedo concluir que:

- Luego de realizadas las primeras evaluaciones a las Sustancias de Referencia Secundaria de Riboflavina, Clortalidona y Mesilato de Bromocriptina, tal como se propuso en el Protocolo para esta Práctica Profesional, se tomó la decisión de descartarlas por su obvia descomposición y su falta de cumplimiento a las pruebas de identificación realizadas inicialmente.
- Se pudieron comparar las características de otras Sustancias de Referencia Secundarias como Acetaminofén, Clorhidrato de Piridoxina, Clorhidrato de Propranolol, Clorhidrato de Ranitidina, Clorhidrato de Verapamilo y Trimetoprim, con el apoyo de las respectivas Sustancias de Referencia Primarias que brinda la Farmacopea de los Estados Unidos, las cuales reposan en el Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos en el I.E.A.
- Luego de verificar la información del etiquetado de las Sustancias de Referencia Secundarias analizadas se observó en algunas la falta del reporte de la riqueza o potencia, la fecha de expiración y las condiciones de almacenamiento, aspectos claves en la presentación de un material que aspira ser utilizado en los análisis del producto farmacéutico que lo representa.
- Ninguna de las Sustancias de Referencia Secundarias evaluadas cumplió con todas las pruebas realizadas, y en algunos casos, el material se descompuso durante la realización de las pruebas.
- La Práctica Profesional nos brindó la oportunidad de poder adquirir destrezas y experticias en la aplicación de métodos analíticos para la evaluación de diferentes tipos de sustancias y en la toma de decisiones a partir de los resultados de los ensayos más determinantes para su evaluación.

RECOMENDACIONES

En base a los objetivos establecidos y las conclusiones de la Investigación desarrollada en esta Práctica Profesional recomendamos lo siguiente:

- El establecimiento en el I.E.A. o en la Industria que proporciona la Sustancia de Referencia Secundaria, de un plan para la evaluación inicial de las características de las Sustancias de Referencia Secundarias, tal como se ha hecho en este trabajo, para que luego sólo se le realicen algunas pruebas claves (p. ejem. Absorción IR, Absorción UV, Intervalo de fusión, Pérdida por secado, Residuo de Ignición y la valoración o Ensayo) para corroborar que la Sustancia de Referencia Secundaria mantiene la calidad apropiada para su uso después de un período largo de almacenamiento.
- Considerar la posibilidad de contar con el apoyo de más personal técnico y capacitado para la actualización de la Base de Datos de las Sustancias de Referencia Secundarias en el Departamento de Desarrollo y Validación de Métodos del I.E.A.
- En los casos de los Establecimientos Farmacéuticos encargados de la entrega de las Sustancias de Referencia Secundarias se le debe brindar el asesoramiento de la importancia del cumplimiento del art. 183 del Decreto 178 del 12 de julio de 2001, relacionado a la información en la etiqueta y la entrega del Certificado de Análisis, para que sólo se tengan que reevaluar algunas de las características.
- Establecer en el I.E.A. una unidad que se encargue exclusivamente del mantenimiento, valoración, codificación y actualización de la base de datos de las Sustancias de Referencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arias, Tomas D. *Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso*. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C.: O.P.S., 1999.
2. Clarke's *Isolation and Identification of Drgs*. The Pharmaceutical Press. Second Edition. London. 1986. Page: 401-402, 464-465, 936-937, 959.
3. COFUSAR. Comité Mexicano de Sustancias Químicas de Referencias. Obtenido en 2005. <http://www.canifarma.org.mx/canifarma/cosufargen.htm>
4. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 7ª Edición. México. 2000 Página: 120.
5. *Farmacopea Internacional - Tercera Edición - Volúmenes 1-4: Métodos Generales de Análisis y Normas de Calidad para Sustancias Farmacéuticas* (WHO, 1996).
6. *Farmacopea Internacional - Tercera Edición - Volumen 5: Pruebas y Requisitos Generales para Formas Farmacéuticas - Normas de Calidad para Sustancias Farmacéuticas y para Comprimidos- versión en inglés* (WHO, 2003).
7. Gras, Dra. Nury. *Control y Garantía de Calidad en laboratorios Analíticos*. Obtenido en el 2005. <http://Vrid.usach.cl/ima/ngras.html>.
8. *Informe Técnico 25° del Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas, Serie 567, 1975*. Página: 102-113.
9. *Introducción al Análisis Cuantitativo (Gravimetrías y Volumetrías)*. Obtenido en el 2005. http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/ailm/TEMAIV.pdf .
10. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Inc. 15th Edition. U.S.A. 1990. Page: 1080-1082, 1086-1087.

11. PROQUIFA-Sustancia de Referencia. Obtenido en el 2005. <http://www.proquifa.com.mx/sustancias.html>.
12. Real Farmacopea Española. 1ª Edición. España. 1997. Página: 5.
13. Sánchez M., Maribel. (2000). Material de Referencia. Certificación de la Concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatinina-quinasa del material de referencia BCR 608. Obtenido en el 2005. http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0708101-220622/msm1de2.pdf.
14. The Japanese Pharmacopoeia. 14ª Edition. Japón. 2001. Page: 113-114.
15. The Merck Index. 13ª Edition. Merck & Co., Inc. U.S.A. 2001. Page: 10, 1403, 1454, 1730, 1771-1772.
16. United States Pharmacopoeia (28) and Natural Formulary (23). United States Pharmacopeial Convention, Inc. U.S.A. 2005. Page: 2204-2233.