

Condiciones experimentales para la determinación por electroforesis capilar de la mezcla ternaria interferente formada por fenilefrina, oxatomida y paracetamol

Vera Candiotti, Luciana¹; Williner, María R.¹; Nepote, Juan A.^{1*}; Mantovani, Víctor²; Olivieri, Alejandro C.³

1- Cátedra de Química Analítica II. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, C.C. 242. (3000) Santa Fe, Argentina. Tel: +54-0342-4575206. Fax: +54 (342) 4575221.

2- Cátedra de Química Analítica I. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. (2000) Santa Fe.

3- Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. (2000) Rosario.

RESUMEN: Fenilefrina, oxatomida y paracetamol, son principios activos de formulaciones farmacéuticas como tabletas descongestivas y antipiréticas. El paracetamol está en un marcado exceso (ca. 100:1 y 20:1 en peso, respectivamente) con relación a los dos restantes. La fuerte absorbancia del paracetamol en relación a los otros analitos, muestra un solapamiento con los espectros de absorción de los compuestos puros, oxatomida y fenilefrina. Esto constituye así un sistema altamente interferente. Este comportamiento es desfavorable para la determinación simultánea de los analitos en la mezcla ternaria por técnicas espectroscópicas convencionales, pero se puede resolver este sistema analítico por electroforesis capilar, la cual es una técnica separativa, con detección mediante absorción de todos los analitos a una misma longitud de onda.

La determinación simultánea de estos tres fármacos por electroforesis capilar, se logró con las siguientes condiciones experimentales: buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2.4 mmol l⁻¹ (pH=4), voltaje de 21 kv y temperatura de 25 °C. La detección se realizó con la longitud de onda de absorción de 203 nm. Los electroferogramas mostraron una resolución adecuada en un tiempo próximo a los 6 minutos.

Palabras claves: Electroforesis capilar, Fenilefrina, Oxatomida, Paracetamol.

SUMMARY: Experimental conditions for determination with capillary electrophoresis of interfering ternary mixture constituted by phenylephrine, oxatomide and paracetamol. Vera Candiotti, Luciana; Williner, María R.; Nepote, Juan A.; Mantovani, Víctor; Olivieri, Alejandro C. Phenylephrine, oxatomide and paracetamol, are active principles of pharmaceuticals formulations, such as decongestives and antipyretics tablets. Paracetamol is in a strong excess (ca. 100:1 and 20:1 in weight, respectively) with respect to the other two compounds. The strong absorbance of the paracetamol shows overlapping with the spectra of pure analytes oxatomide and phenylephrine. This gives rise to a highly interfering system. This characteristic is a disadvantage for simultaneous determination of the analytes in the ternary system with conventional spectrophotometric techniques, but it can be solved by capillary electrophoresis, a separative technique with absorbimetric detection of all analytes at the same wavelength.

The simultaneous determination of this three pharmaceuticals with capillary electrophoresis, is achieved with following the experimental conditions: buffer phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2.4 mmol l⁻¹ (pH=4), voltage 21 kV and temperature 25 °C. The detection is carried out at the absorption wavelength 203 nm. The electroferograms show an adequate resolution on time nearly 6 minutes.

Keywords: Capillary, Electrophoresis, Phenylephrine, Oxatomide, Paracetamol.

Correspondencia y pruebas

Nepote, Juan Alberto. Cátedra de Química Analítica II. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. Ciudad universitaria, Paraje El Pozo, C.C. 242. (3000) Santa Fe, Argentina.
Tel: +54 (342) 4575206. Fax: +54 (342) 4575221.

* E-mail: janepote@lbc.b.unl.edu.ar

Introducción

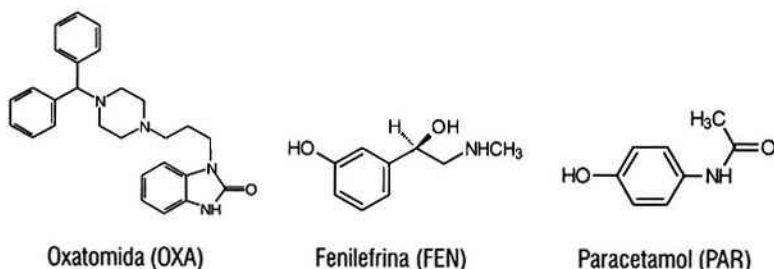
Varias tabletas farmacéuticas descongestivas y antipiréticas, contienen una mezcla del descongestivo fenilefrina y el antialérgico oxatomida, en presencia de un alto exceso del analgésico y antipirético paracetamol.

La Oxatomida, (OXA), 1-[3-(4-bencilidilpiperazina-1-il)propil]-bencimidazolín-2-ona, es un derivado de la piperazina, que actúa como antagonista de receptores H₁ histamínicos (1), se emplea para inhibir reacciones alérgicas y otras reacciones de hipersensibilidad incluyendo urticaria, rinitis y conjuntivitis. La (R)-fenilefrina, (FEN), (R)-2-metilamino-1-(3-hidroxifenil) etanol, es un agente simpaticomimético

con efectos directos sobre los alfa-adrenoreceptores (2), que se emplea principalmente como descongestivo nasal. El Paracetamol, (PAR), 4-Acetaminofenol, es un fármaco eficaz que se usa como analgésico-antipirético, evitando la generación de efectos colaterales de la aspirina y se puede emplear en pacientes con síntomas gástricos, que reciben anticoagulantes orales, o que presentan trastornos de la coagulación (3).

En la Fig. 1 se puede observar donde están las cargas positivas en cada fármaco, de acuerdo a sus estructuras químicas y pKs. Los pKs para cada sustancia estudiada son los siguientes: para la OXA, 4.5 (=O) y 10.1 (-NH-) a 20°C; para la FEN 8.9 (-OH) y 10.1 (-NH-) a 25°C; y para el PAR 9,5 a 25°C.

Figura 1: Estructuras químicas de los fármacos estudiados.



FEN ha sido determinada en diversas formulaciones farmacéuticas por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (4-7), titulación iodométrica (8), espectrofotometría (9), resonancia magnética nuclear protónica (10), análisis por inyección de flujo (11) y espectrofluorimetría (12,13). Se ha informado sobre la determinación de OXA en fármacos por espectrofluorimetría (13), y se ha determinado en suero humano por HPLC (14). Por otra parte, PAR ha sido determinado en diversas formulaciones farmacéuticas por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (5,15,16), quimioluminiscencia (17,18), titulación potenciométrica (19), análisis por inyección de flujo (20,21) y espectrofotometría (22,23).

En preparaciones farmacéuticas comunes el PAR se encuentra en un marcado exceso con respecto a FEN y OXA, con relaciones en peso de ca. 100:1 y 20:1, respectivamente. De esta forma, la de-

terminación simultánea de estos fármacos en una mezcla ternaria mediante espectrofotometría convencional, no es posible, debido a que el espectro de absorción de PAR muestra un solapamiento con los débiles espectros de absorción de los componentes menores. En el presente trabajo se analizaron las condiciones experimentales para resolver la mezcla compleja de FEN, OXA y PAR, mediante el empleo de electroforesis capilar de zona. Esta es una técnica donde la separación tiene lugar cuando los analitos, bajo la influencia de un campo eléctrico, se mueven hacia el detector con diferentes movilidades efectivas (24,25). Cuando se desea obtener la cantidad de cada fármaco que contiene una mezcla ternaria, el gran exceso de PAR no interfiere sobre las cantidades menores de FEN y OXA, debido a que cada uno posee una movilidad electroforética característica. La movilidad electroforética es proporcional a la carga del analito e inversamente proporcional a las fuer-

zas de fricción, o retraso, que dependen de la forma y tamaño de los analitos (Fig. 1), así como de la viscosidad del medio. En el momento de la detección por medio de la absorción de energía radiante por parte de cada analito, la señal no se ve afectada por la interferencia del resto de los compuestos. Por otra parte, la electroforesis capilar de zona es una técnica apropiada para el análisis de los principios activos de muestras farmacológicas, debido a su simplicidad, especificidad y sensibilidad. Además, es más rápida y de menor costo que la HPLC para los controles de calidad farmacológicos de rutina.

Para encontrar las variables que permitieron resolver adecuadamente el sistema analítico, se varió la concentración del buffer y el voltaje aplicado, manteniendo constante el tipo de buffer; la temperatura se fijó en 25 °C. Del espectro de los compuestos puros obtenidos con un espectrofotómetro, se seleccionó la longitud de onda para la detección de los mismos.

Materiales y Métodos

Reactivos

Para la preparación de las soluciones de calibración y mezclas artificiales, se emplearon: FEN (Laboratorios Saporiti, Buenos Aires, Argentina), OXA (Janssen-Cilag, Buenos Aires, Argentina), y PAR (Sigma, WI, USA), de calidad grado analítico. Las soluciones patrones madres acuosas preparadas fueron las siguientes: FEN (100 mg l⁻¹), OXA (500 mg l⁻¹) y PAR (1000 mg l⁻¹). La muestra comercial se obtuvo de Phoenix (Buenos Aires, Argentina). En todos los casos se empleó agua ultrapura (0 miliQ). Antes de su uso en la experimentación por electroforesis, las soluciones de electrolito, las soluciones patrones y las preparaciones farmacéuticas artificiales y comerciales, fueron filtradas a través de filtros de acetato de celulosa de 0.20 µm (Sartorius) y desgasificadas en un baño ultrasónico durante 10 minutos.

Instrumentos y software

Equipo de Electroforesis capilar Spectra PHORESIS 100. Detector UV variable (Thermo Separation Products, San José, California, USA). Los capilares de sílice de 75 µm de diámetro interno, 70 cm longitud total y 42 cm de longitud de detección, fueron provistos por la misma empresa. A los fines

de determinar la longitud de onda de detección de los fármacos en estudio, se realizaron los espectros de absorción electrónica de cada uno en soluciones patrones, con un Espectrofotómetro Cecil UV / Visible, usando cubeta de cuarzo de 1.00 cm. Además los siguientes paquetes de software fueron empleados en este trabajo: STATGRAPHICS Version 5.0, para el diseño estadístico y SIGMAPLOT Version 4.0, para el análisis de la regresión no lineal.

Soluciones patrones, muestras comerciales y buffers

Las soluciones patrones de FEN, OXA y PAR fueron preparadas en agua ultrapura, a partir de las soluciones madres de 5, 30 y 500 mg l⁻¹, respectivamente. Para determinar las condiciones de resolución de las mezclas, se prepararon muestras artificiales, a partir de las soluciones patrones de cada analito, mezclado en matraces de 10 ml, los volúmenes calculados, para cada analito a fin de obtener las siguientes concentraciones finales: FEN (5 mg l⁻¹), OXA (30 mg l⁻¹) y PAR (500 mg l⁻¹), respetando la relación, ca. 1:6:100, respectivamente, que es la relación con que se encuentran en la muestra comercial. Para preparar ésta última, se pesaron diez tabletas comerciales, se obtuvo el promedio del peso que fue de 764.7 mg, se molieron y mezclaron. Se obtuvo una solución de la muestra comercial, disolviendo ca. 76.47 mg de las tabletas molidas anteriormente, en aproximadamente 20 ml de 0.05 mol l⁻¹ NaOH, neutralizando con 1 ml de HCl 0.1 mol l⁻¹, filtrando y completando a volumen en un matraz de 100 ml, con agua ultrapura de modo de obtener concentraciones finales de los analitos, que se ajusten a la relación en peso similar a la referida anteriormente.

Las soluciones buffer de fosfato (Na₂HPO₄·2H₂O), pH = 4, fueron ajustadas en el rango de concentraciones: 2 - 30 mmol l⁻¹. Todas fueron preparadas en el día, filtradas y desgasificadas antes de su uso.

Resultados y Discusión

Selección del pH y longitud de onda para la detección

Teniendo en cuenta las estructuras de los fármacos (Fig. 1) y sus pKs, se puede determinar que los mismos presentarán cargas positivas a pH ácidos. A partir de informes anteriores, se analizó el comportamiento de la absorbancia en función del pH,

para cada compuesto (12,13). De tales informes se extrajeron los siguientes datos: FEN presenta un pico de absorbancia a 272 nm, a pH=4.04; la OXA a 280 nm, a pH=4.50 y PAR a 240 nm, a pH=4.14. Como se puede observar a pH=4, los tres analitos muestran sus picos de absorbancias en una zona próxima a 240 nm. En base se realizó la experiencia a este pH, para poder detectar estos fármacos mediante la absorción de radiación electromagnética en una zona próxima esa longitud de onda.

Para precisar la longitud de onda de detección se realizaron con el SpectraPHORESIS 100, los espectros de los compuestos puros, y se observó que ésta debía ubicarse a 203 nm. Esto debido a que la λ a la que el detector mostró mayor sensibilidad para estos compuestos fue 203 nm, siendo ésta la que se seleccionó.

Selección de la concentración del buffer y el voltaje aplicado

En las tabletas comerciales seleccionadas como sistema analítico para realizar este estudio, el

PAR es el compuesto que se encuentra en mayor concentración de las tres drogas analizadas. Además posee la menor movilidad electroforética, en las condiciones ensayadas en este trabajo. En contrapartida la FEN es la menos concentrada y la de mayor movilidad electroforética, para el pH=4, debido a su forma, tamaño (Fig. 1), y las cargas positivas de acuerdo a sus pKs. Con estos datos experimentales, se determinaron condiciones relativas a la concentración del buffer y el voltaje aplicado, para obtener una buena resolución en el menor tiempo de migración, t_m . Para encontrar estas condiciones se realizó un diseño de experimento, con nueve combinaciones de la concentración del buffer y el voltaje aplicado. Tomando estos dos como variables independientes y al t_m como variable dependiente. Se dejó fijo el pH=4, y la detección con la longitud de onda de absorción a 203 nm. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 1. La superficie de respuesta obtenida indica que el menor t_m , se obtiene para una concentración de buffer de 2.4 mmol l⁻¹ y un voltaje aplicado de 21 kV.

Tabla 1: Planilla experimental de la matriz diseñada: variables, tiempos de migración obtenidos y resolución entre FEN y OXA.

Matraz	Resolución Entre FEN y OXA	Concentración Buffer Na HPO ₄	Voltaje (kV) V _{aplic}	Tiempo de migración (t _m)		
		2 H ₂ O (mmol l ⁻¹) C _{Buffer}		FEN	OXA	PAR*
1	3.86	2.4	17	3.92	4.18	6.46
2	1.51	6.3	15	4.55	4.89	7.50
3	1.60	6.3	20	3.19	3.43	5.27
4	1.60	15.66	14	5.54	6.02	10.11
5	1.60	15.66	17	4.31	4.67	7.79
6	1.50	15.66	21	3.18	4.45	6.18
7	1.67	25.17	15	5.36	5.86	10.46
8	1.38	25.17	20	3.56	3.87	6.88
9	1.78	29.22	17	4.8	25.31	10.18

*La concentración de PAR empleada fue de 500 mg l⁻¹, manteniendo la relación en peso con la FEN y OXA (ca. 100:1:6 respectivamente), presente en la muestra comercial.

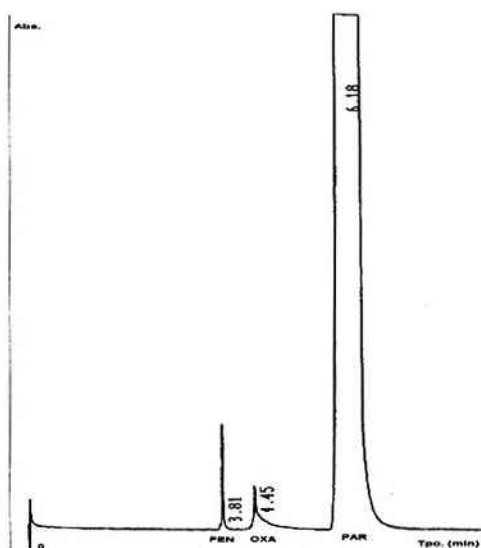
Resolución

La resolución de los picos del electroferograma de las muestras comerciales (Fig. 2) para cada analito fue calculada como:

$$R = 2 (t_2 - t_1) (w_1 + w_2)^{-1} \quad [1]$$

Donde t_1 y t_2 representan los tiempos de migración de los analitos 1 (FEN) y 2 (OXA); y w_1 y w_2 son los anchos de zona de los picos medidos sobre la línea de base (24-26). Se considera que las dos especies están resueltas cuando R es mayor a 1.5. En la Tabla 1 se presentan los datos de resolución entre FEN y OXA, en la segunda columna.

Figura 2: Electroferograma de la muestra comercial (tabletas de Causalon, Laboratorio Phoenix, Buenos Aires, Argentina), donde se indican los tiempos de migración en minutos para cada fármaco. Las áreas para cada pico se indican a continuación, entre paréntesis: FEN (0.781), OXA (4.053), y PAR (95.182). El corte que presenta el pico del PAR, es debido a la elevada concentración del mismo.



Conclusiones

Los resultados mostraron que los tres compuestos se resuelven adecuadamente en aproximadamente de 6 minutos con el protocolo propuesto, siendo el orden de aparición: fenilefrina, oxatomida y paracetamol. Este último no ocasiona interferencias, a pesar de estar en un marcado exceso.

Estos resultados demuestran que la electroforesis capilar es una técnica muy adecuada para la resolución de este tipo de preparaciones donde uno de los compuestos está en marcado exceso, siendo además una técnica sencilla y rápida.

Bibliografía

- 1- J. E. F. Reynolds, 1993. "Martindale "The Extra Pharmacopoeia" Ed., The Pharmaceutical Press (London). 942.
- 2- Ref. 1, p. 1251.
- 3- A. Goodman-Hillman, T. Rall, A. Nier, P. Taylor, 1996. "The Pharmacological Basis of Therapeutics" McGraw-Hill (New York). 636-720.
- 4- Kanumula, G.V.; Raman, B.; Bhoir, I.C., 2001. Concurrent analysis of a multicomponent dosage formulation containing chlorpheniramine maleate, phenylephrine hydrochloride, caffeine and acetaminophen by RP-HPLC with wavelength programming. *Indian-Drugs* 4, 38: 203-207.

- 5- Muszalska, I.; Zajac, M.; Czajkowski, K.; Nogowska, M., 2000. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, ascorbic acid and phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical formulations by HPLC. *Chem Anal (Warsaw)* **6**, 45: 825-833
- 6- Hughes, D.E., 1983. Simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, chlorpheniramine maleate and sodium benzoate by reversed-phase, paired-ion and competing-base high-performance liquid chromatography. *J-Chromatogr.* **262**:404-407.
- 7- Chawla, J.L.; Sodhi, R.A.; Sane, R.T., 1997. Simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, triprolidine hydrochloride and paracetamol by HPLC and HPTLC methods. *Indian-Drugs* **6**, 34: 339-345.
- 8- Amer, M.M.; Khatib, F.I.; Hassan, N.Y.M., 1989. Titrimetric determination of some pharmaceutical compounds using some halogenated derivatives. *Egypt J Pharm Sci.* **1-4**, 30: 207-220.
- 9- Collado, M.S.; Mantovani, V.E.; Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C., 2000. Simultaneous spectrophotometric-multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions; phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal. *Talanta* **5**, 52: 909-920.
- 10- Shoukrallah, I.; Sakla, A.; Paletta, B., 1990. Quantitative determination of some pharmaceuticals in bulk drugs and tablets by proton magnetic resonance (PMR) spectroscopy. *Farmaco.* **4**,45: 455-463.
- 11- Mestre, Y.F.; Zamora, L.L.; Calatayud, J.M., 2001. Determination of phenylephrine hydrochloride by flow-injection analysis with chemiluminescence detection. *J AOAC Int* **1**,84:13-18.
- 12- Arancibia, J. A.; Nepote, A. J.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C., 2000. Spectrophotometric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. *Anal. Chim. Acta* **419**: 159-168.
- 13- Nepote, J. A. .; Olivieri, A. C., 2000. Simultaneous spectrophotometric determination of oxatomide and phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. *Anal. Chim. Acta* **439**: 87-94.
- 14- Fujii, J.; Inotsume, N.; Nakano, M.; Matsukane, I.; Higashi, A.; Matsuda, I.; Sudo, Y.; Takahata, Y., 1990. Rapid determination of serum oxatomide levels with online pre-column solid-phase extraction. *J. Chromatogr, Biomed. Appl.* **2**, 95:469-473.
- 15- Vasudevan, M.; Ravisankar, S.; Ravibabu, T.; Nanjan, M.J., 2000. Simultaneous estimation of paracetamol, methocarbamol and ibuprofen by a reversed-phase HPLC method. *Indian-Drugs* **8**, 37(): 386-389.
- 16- Zhou, S.L.; Shen, G.; Zhong, H.F.; Zhang, A.Z., 1993. Reversed-phase HPLC determination of paracetamol in roal drops. *Zhongguo-Yaoxue-Zazhi* **4**,28: 235-236.
- 17- Gregorio Alapont, A.; Lahuerta Zamora, L.; Martinez Calatayud, J., 1999. Indirect determination of paracetamol in pharmaceutical formulations by inhibition of the luminol/hydrogen peroxide/hexacyanoferrate(III) chemiluminescence system. *J Pharm Biomed Anal* **2**,21: 311-317.
- 18- Koukii, I.I.; Calokerinos, A.C.; Hadjiioannou, T.P., 1989. Continuous-flow chemiluminescence determination of acetaminophen [paracetamol] by reduction of cerium(IV). *Analyst* **6**,114: 711-714
- 19- Vyas, P.N.; Kharat, R.B., 1988. Potentiometric titration of paracetamol in non-aqueous medium. *Indian J Pharm-Sci* **5**,50: 279-281.
- 20- Ruiz Medina, A.; Fernandez de Cordova, M.L.; Molina Diaz, A., 1999. A very simple resolution of the mixture paracetamol and salicylamide by flow injection-solid phase spectrophotometry. *Anal Chim Acta* **2-3**,394: 149-158.
- 21- Martinez Calatayud, J.; Pascual Marti, M.C.; Sagrado Vives, S., 1986. Determination of paracetamol by a flow-injection - spectrophotometric method. *Anal Lett.* (19-20) **19**: 2023-2038.
- 22- Tantishaiyakul, V.; Phadoongsombut, N.; Kamaung, S.; Wongwiswansri, S.; Mathurod, P., 1999. Fourier transform infrared spectrometric determination of paracetamol and ibuprofen in tablets. *Pharmazie* **2**,54: 111-114
- 23- Eustaquio, A.; Graham, P.; Jee, R.D.; Moffat, A.C.; Trafford, A.D., 1998. Quantification of paracetamol in intact tablets using near-infrared transmittance spectroscopy. *Analyst* **11**, 123:2303-2306.
- 24- N. Guzmán, 1993. "Capillary Electrophoresis Technology". Marcel Dekker Inc. (New York), 857-995.
- 25- D. R. Baker, 1995. "Capillary electrophoresis". John Wiley & Sons, Inc. (New York), 54-105.
- 26- P. D. Grossman, J. C. Colburn , 1992. "Capillary electrophoresis. Theory and practice". Academic Press, Inc., (San Diego).