

Validación de un método espectrofotométrico para la determinación de clorhidrato de bromhexina en formas farmacéuticas líquidas, basada en la reacción de Bratton-Marshall

ALEXIS BUITRAGO, SUSANA GONZÁLEZ Y LAURA CALDERÓN*.

*Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Departamento de Análisis y Control, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. E-mail: lauram@ula.ve

Recibido mayo 2005 - Aceptado octubre 2005

RESUMEN

Se ha desarrollado una aplicación espectrofotométrica, basada en la reacción de Bratton-Marshall, para la determinación selectiva del clorhidrato de bromhexina en preparaciones farmacéuticas líquidas y en presencia de p-hidroxibenzoato de metilo y propilo. Se utilizó la 1-Naftilamina, en lugar del diclorhidrato de N-(1-Naftil)etilendiamina (reactivo de Bratton-Marshall), para la formación del azo compuesto coloreado, cuya más alta intensidad de color, se produjo a 478 nm, en menos de 5 minutos y permaneciendo estable al menos por 24 horas. Las condiciones de reacción fueron optimizadas y las características de desempeño del método fueron estudiadas estadísticamente, revelando buena precisión (por repetibilidad del método y por precisión intermedia) y alta exactitud (recuperación >99,2%). Los gráficos de calibración fueron lineales desde 2 mg L⁻¹ hasta 8 mg L⁻¹ ($r^2 = 0,998$; $K = 7$, $j = 3$, $n = 21$). El procedimiento fue rápido, simple y adecuado como método de control de rutina. Los resultados obtenidos mostraron parámetros de validación en concordancia con la técnica potenciométrica para bromhexina materia prima y la de cromatografía líquida de alta presión para las preparaciones farmacéuticas; con un nivel de confianza del 95%.

PALABRAS CLAVE

Validación, bromhexina, jarabes, parabenos, diazoación, copulación, espectrofotometría.

ABSTRACT

A spectrophotometric application of the Bratton-Marshall reaction is developed for specific determination of bromhexine hydrochloride in presence of methyl and propyl p-hydroxybenzoate in pharmaceutical formulations. The N-naphthylamine was used, instead of

N-(1-Naphthyl)ethylendiamine dihydrochloride (Bratton-Marshall reagent), to the fast formation of the colored azo dye which absorbs maximally at 478 nm and was stable at least for 24 h. Analytical performance characteristics were established and statistical analysis of the results has been carried out revealing good precision (method repeatability and intermediate precision) and high accuracy (recovery was > 99.2%). Regression analysis showed good correlation in the concentrations ranges 2.0 - 8.0 mg L⁻¹ ($r^2 = 0.998$, $k = 7$, $j = 3$, $n = 21$). The procedure was rapid, simple and suitable for quality control application. The validity of the described procedures was assessed and the results are in agreement with those obtained by potentiometric titration for bromhexina bulk drug and by high-performance liquid chromatograph technique for pharmaceutical formulations, at 95% confidence level.

KEY WORDS

Validation, bromhexine, mixtures, parabenos, diazotization, copulation, spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

La bromhexina (2-amino-3,5-dibromo-N-ciclohexil-N-metil-benceno metenammina), es químicamente una base débil con un valor de pKa de 8,5; ligeramente soluble en agua por lo que se presenta bajo la forma de clorhidrato (Gober et al., 1988), (Rauha et al., 1996). Farmacológicamente es un agente mucolítico, ampliamente usado en el tratamiento de desórdenes respiratorios asociado con producción de tos. Es también utilizada como un coadyuvante para incrementar la respuesta de los antibióticos en el tratamiento de infecciones respiratorias (Litter, 1980).

La bromhexina se presenta bajo diversas formas farmacéuticas, tales como tabletas, jarabes, elixir e inyectables (Spilva y Mukhtans, 2004), (Martindale, 2002).

Las formas farmacéuticas líquidas son favorables por su fácil preparación, su administración y por la biodisponibilidad de los principios activos (Cárdenas y Cortés, 1996). Sin embargo, para asegurar la estabilidad de las formas farmacéuticas líquidas, se requiere la adición de conservadores como los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico (parabenos). El metilparaben (PHBM) y propilparaben (PHBP) son los parabenos más ampliamente usados y van juntos, desde que ellos tienen efectos sinérgicos (Helman, 1982), (Vila, 1995).

El problema que se presenta para determinar el contenido de bromhexina en formas farmacéuticas líquidas es la normal interferencia causada por los parabenos, dada su considerable absorción en la región UV del espectro (Fig. 1). De los textos oficiales consultados, la Farmacopea Europea (European Pharmacopoeia, -EP-, 1997) y la Farmacopea Británica (British Pharmacopoeia, -BP-, 1988), reportan la cuantificación de la materia prima a través de una titulación potenciométrica no selectiva. Para analizar productos se requiere que el método empleado para la cuantificación sea: exacto, preciso, específico, sensible, económico y sobre todo de rápida y fácil ejecución.

Para el análisis de rutina de los productos con bromhexina, donde el analito aparece junto con otros compuestos, las técnicas de separación son siempre requeridas. La técnica espectrofotométrica ha sido empleada con extracción previa, como lo reporta Rao et al. (2005), basándose en la formación de asociaciones iónicas con colorantes ácidos, solubles en cloroformo.

preparaciones farmacéuticas por Argecar y Powar (1998) y por Sumarlyk e Indrayanto (2004). La técnica por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), es la más frecuentemente usada para la determinación del clorhidrato de bromhexina, (Rauha et al., 1996), (Chu y Tin, 1998). Para la determinación simultánea de sulfas y compuestos relacionados, donde se incluye a la bromhexina, Berzas et al. (2001), presentaron un procedimiento por CLAR reportando un límite de cuantificación de $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ y un tiempo de corrida de 13 minutos. El uso de microemulsiones de dextrina-modificada con detección electroquímica, ha sido reportado por Okamoto et al. (2005). Estos métodos son en general muy específicos pero también requieren de equipos especializados (por lo tanto costosos), alto consumo de solventes orgánicos puros, la adecuación del sistema para lograr la resolución, un tratamiento específico de la muestra, tiempo prolongado de análisis y la necesidad de personal especializado.

Santorio et al. (1984), cuantificaron bromhexina utilizando el reactivo de Bratton-Marshall, donde el azo compuesto permaneció estable por 45 minutos. Por años, el método de Bratton y Marshall (Bratton et al., 1939) ha sido usado y puede ser aplicado tanto manual como automatizado, éste último basado en el principio de flujo continuo (Bye y Fox, 1974), (Dias et al., 2003). También se aplica a la CLAR, como el reportado por Carda et al. (1997).

En el presente trabajo, la sal de diazonio formada con la bromhexina reaccionó con la 1-Naftilamina, en un corto tiempo y bajo condiciones controladas. El método se hace selectivo para la bromhexina, dada la ausencia del grupo amino aromático primario en los parabenos [Fig. 1B y 1C]. Se incluye aquí un reporte, como prueba de aplicabilidad, de los resultados del análisis en materia prima y muestras comerciales. El método fue validado de acuerdo a los criterios establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos de América (The United States Pharmacopoeia, -USP- 27, 2004), para un método de ensayo no farmacopeicos y para una determinación Categoría I. La validación se apoya en las características de desempeño analítico del método propuesto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos y reactivos

Todos los químicos y reactivos usados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las siguientes fuentes: clorhidrato de bromhexina (cedido por PlusAndex, Mérida, Venezuela), fue usada como patrón de trabajo; clorhidrato de bromhexina (cedida por PROULA Medicamentos, Mérida, Venezuela), usado como muestra de materia prima (MP), después de evaluar los correctos niveles de pureza establecidos por la EP (1997); los

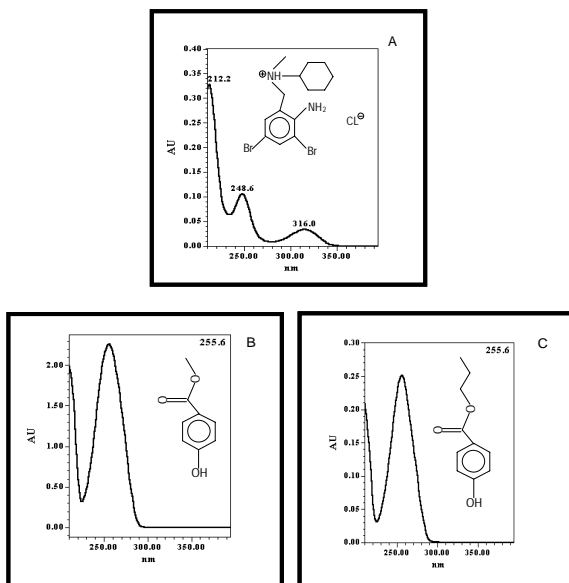


Figura 1. Espectros UV (A) clorhidrato de bromhexina, (B) metilparaben y (C) propilparaben.

La cuantificación por cromatografía en capa fina (CCF) con detección densitométrica fue utilizada en

parabenos PHBM y PHBP y el colorante rojo fresa (CRF) (cedidos por PROULA Medicamentos, Mérida, Venezuela), fueron usados en la preparación de la matriz de excipientes; etanol y ácido clorhídrico de Merck (Darmstadt, Germany), nitrito de sodio, sulfamato de amonio y 1-Naftilamina de Riedel-deHaën (Seelze, Germany); diclorhidrato de N-(1-Naftil)etilendiamina de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Todas las soluciones fueron preparadas con agua obtenida con un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) y así se tienen: ácido clorhídrico 4 M; solución acuosa de nitrito de sodio 15 mM, (almacenada a 4 °C y en la oscuridad, permaneció estable por una semana); solución acuosa de sulfamato de amonio 44 mM; solución acuosa de 1-Naftilamina 7 mM y solución acuosa de diclorhidrato de N-(1-Naftil)etilendiamina 4 mM, siendo las dos últimas soluciones preparadas el día del ensayo, almacenadas a 4 °C protegidas de la luz y se utilizaron a esa temperatura.

Instrumentación y condiciones

Las medidas fueron obtenidas con un espectrofotómetro UV-Visible, marca Perkin-Elmer modelo Lambda 11 (Norwalk, CT, USA), calibrado según las especificaciones de la USP XXVII (2004), y procesado con el programa UV WinLab 2,0 para la adquisición, procesamiento y almacenamiento de los datos (reportado como I-A); un espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer modelo Coleman 55 (Norwalk, CT, USA) usado para los ensayos de precisión intermedia (reportado como I-B). Se utilizó un medidor de pH marca Orión modelo 720-A (Termo Orión, Beverly, MA, USA). La longitud de onda analítica fue seleccionada inicialmente a través de la cuantificación del azo compuesto formado entre el diclorhidrato de N-(1-Naftil)etilendiamina y la sal de diazonio de la bromhexina, usando las condiciones publicadas por Santorio et al. (1984), como punto de partida y luego con el reactivo de trabajo, el 1-Naftilamina, seleccionando los 478 nm como la longitud de onda analítica.

Tratamiento de las muestras

Las muestras comerciales ensayadas fueron: Brontol Elixir 4 mg/5mL (Elixir) (Laboratorio Farmacoop, Bogotá, Colombia) y Bexilón Jarabe 4 mg/5mL (Jarabe) (Laboratorio PlusAndex, Mérida, Venezuela). La cuantificación de la cantidad de bromhexina en las muestras se realizó sin mayor tratamiento. Se incluyó también la muestra de MP.

Optimización del método

La velocidad de la reacción es indicada por la velocidad de desarrollo del color, la cual depende de la velocidad de ataque del reactivo cromóforo a la sal de

diazonio. Las diferentes reacciones que dan como producto final el compuesto azo coloreado han sido reportadas por Fox y Whitesell (2000) y por Morrison y Boyd (1973).

Para optimizar el desarrollo del color y la conformidad con la Ley de Lambert y Beer, se investigaron un número de variables químicas y físicas como concentración del reactivo cromóforo, pH (1 a 4 unidades), temperatura (de 25 a 3 °C), tiempo de reacción (desde 0 a 30 minutos) y estabilidad del compuesto coloreado (hasta 24 horas).

Preparación de la curva de calibración

Se trabajó siempre con una solución madre de clorhidrato de bromhexina patrón de trabajo en etanol, con una concentración de 2,5 mg mL⁻¹, que se utilizó siempre de reciente preparación, conservada a 4 °C y protegida de la luz. Un volumen de esta solución fue llevado por dilución con agua a una concentración de 0,05 mg mL⁻¹, constituyendo la solución de trabajo del patrón. Para obtener el intervalo óptimo de concentración se preparó con la solución anterior la curva de Ringbom, cubriendo el rango entre 80 y 120% del valor nominal de la muestra (USP XXVII, 2004), (ICH, Noviembre 1995), se leyó a la longitud de onda de 478 nm y se escogió la parte lineal, y se trabajó con siete niveles de concentración: 2; 3; 4; 5; 6; 7 y 8 mg L⁻¹. A cada punto de la curva se le aplicó el procedimiento de diazoación y copulación. El procedimiento fue repetido tres veces (j = réplicas) y en cada caso el análisis de regresión lineal fue aplicado (K=7, j=3, n=21). La dilución con el nivel de concentración de 4 mg L⁻¹, que corresponde al valor nominal de la muestra, se preparó consecutivamente 6 veces para estudiar el parámetro de selectividad y repetibilidad del sistema y las soluciones de concentraciones 2, 4 y 8 mg L⁻¹, se utilizaron para estudiar el parámetro de repetibilidad del método. Adicionalmente la curva de calibración fue preparada por triplicado durante tres días consecutivos, tanto por el Analista 1 como por el Analista 2, y fueron medidas por triplicado en el I-A y en el I-B, para determinar la precisión intermedia.

Matriz de excipientes

Conociendo los excipientes y las proporciones en que usualmente se emplean en las formas farmacéuticas líquidas (Vila, 1995) y de ellos, los identificados como posibles interferentes (Rao, 2005), (Rauha, 1996), se elaboró la matriz de excipientes para estudiar la selectividad por adición de las interferencias, simulando los productos y con un blanco para la MP y se reportan los resultados como porcentaje de discrepancia (A.E.F.I., 2001).

Productos	Materia Prima (MP)
Matriz de excipientes	Blanco
Patrón Bromhexina (4 mg L ⁻¹)	Patrón Bromhexina (4 mg L ⁻¹)
Matriz de excipientes + patrón bromhexina	

Para ello se prepararon separadamente, soluciones madre de los conservadores PHBM y PHBP y del CRF en etanol, y de cada una se tomaron las cantidades requeridas para obtener soluciones de trabajo a las concentraciones de 350 mg L⁻¹ para PHBM, 40 mg L⁻¹ para el PHBP y 12,5 mcg L⁻¹ para el CRF. Se tomó 1 mL de cada una de las soluciones de trabajo y se llevaron a un mismo frasco volumétrico de 50 mL, para serle aplicado el procedimiento de diazoación y copulación. Se repitió el procedimiento con 2 mL de cada una de las soluciones de trabajo y todas se prepararon 6 veces para estudiar el parámetro de selectividad en la forma farmacéutica y con un blanco para la materia prima.

Preparación de la muestra

Se midieron exactamente volúmenes de las muestras (Elixir y Jarabe), equivalentes a 4 mg de bromhexina, y de una dilución de la MP, preparada como se indicó en la preparación de la curva de calibración para la solución de trabajo del patrón. Se llevaron estos volúmenes separadamente a frascos volumétricos de 100 mL y se diluyeron con agua a volumen, siendo estas las soluciones de trabajo de las muestras. Se tomaron 5 mL de cada una de las soluciones de trabajo y se llevaron a frascos separados de 50 mL, para serle aplicado el procedimiento de diazoación y copulación. El procedimiento se repitió seis veces para medir la precisión por repetibilidad del método, preparando soluciones de 2, 4 y 8 mg L⁻¹ de las muestras. Adicionalmente se realizó durante tres días consecutivos para medir la precisión intermedia.

Procedimiento para la diazoación y copulación

Durante todo el desarrollo de las reacciones se mantienen los frascos de 50 mL en un baño de hielo. A cada frasco de 50 mL, tanto de los puntos de la curva de calibración como de las muestras (MP, Elixir y Jarabe), la matriz de excipiente y el blanco, se le añade 1 mL de ácido clorhídrico 4 M, se agita utilizando un mezclador mecánico tipo vortex, se le adiciona 5 mL de solución de nitrito de sodio 15 mM, se agita de nuevo y se deja en reposo por 3 minutos; se le añade 5 mL de solución de sulfamato de amonio 44 mM, seguidamente se agita y se deja en reposo por 2 minutos, luego se añade 5 mL del agente copulador 1-Naftilamina 7 mM,

se agita utilizando el vortex y se enrasa con agua hasta 50 mL. La absorbancia de cada una de estas soluciones es medida tres veces en el espectrofotómetro a la longitud de onda analítica de 478 nm.

Método analítico independiente

Para compensar el que no se utilizara un patrón de referencia certificado se realizó una valoración de bromhexina con un método de análisis independiente más selectivo y específico como es la CLAR en fase reversa, por ello se escogió el publicado Rauha et al. (1996), donde los autores determinaron bromhexina simultáneamente con los conservadores PHBP y PHBM en jarabes.

Ensayos de validación

Las características típicas de un desarrollo analítico se validaron utilizando las especificaciones establecidas tanto en la USP 27 (2004), como en la A.E.F.I. (2001), para un método no normalizado en su categoría I (cuantificación de principios activos). Es así que se estudiaron: selectividad por la adición de las interferencias y se calculó como porcentaje de discrepancia; linealidad e intervalo, precisión (repetibilidad del sistema y del método y precisión intermedia) y la exactitud por la adición del patrón (1 mL de cada una de las soluciones de 2, 3 y 4 mg L⁻¹) sobre el problema y se determinó la recuperación; para la materia prima por comparación con un método oficial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de las condiciones de reacción

Reactivo cromóforo

Dada la rapidez de la reacción y estabilidad del complejo coloreado se escogió como reactivo de acoplamiento el 1-Naftilamina, demostrando que es sensible, puro, produce resultados reproducibles y además de que el azo compuesto formado permanece estable en medio ácido.

Efecto de la acidez

En nuestra investigación con 1-Naftilamina, la reacción procede en condiciones de pH de forma muy similar a lo reportado por Rao (2005), con el uso de N-(1-Naftil)etilendiamina. Como se muestra en la Figura 2, a pH entre 1,1 y 1,75 se produjo un gradual incremento en la absorbancia; considerando un pH de 1,75 como el valor óptimo. Una disminución de la acidez produjo un leve descenso en la absorbancia.

Figura 2. Efecto del pH en la absorbancia de 4 mg L⁻¹ de bromhexina (n = 6, C.V.= 0,3%)

Efecto de la temperatura y el tiempo de reacción

En el desarrollo del método con 1-Naftilamina, se trabajó a temperatura ambiente (18 °C y 25 °C), y a temperaturas bajas entre los (3 °C y 10 °C). Los mejores resultados se obtuvieron a 5 °C, concordando así con los obtenidos con N-(1-Naftil)etilendiamino diclorhidrato (Rao 2005).

Se observó también que la señal analítica se logró con rapidez e incrementó considerablemente en el rango de 1 a 5 minutos, a partir del cual se mantiene. Extendiéndose el tiempo hasta 30 minutos la señal se presenta constante. Cuando se ha utilizado el reactivo de Bratton-Marshall, se reporta como tiempo de reacción mayor a 10 minutos. Se concluye que la reacción es rápida y que se puede reportar 5 minutos como el tiempo de reacción.

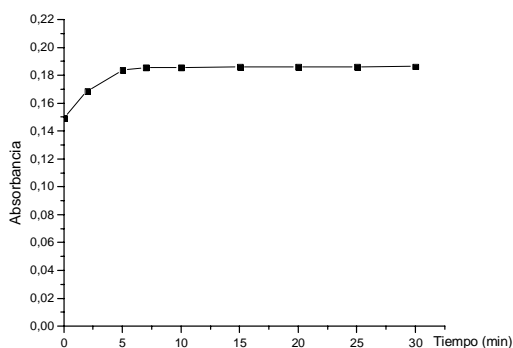


Figura 3. Tiempo de reacción y estabilidad del complejo coloreado (4 mg L⁻¹ de bromhexina a 5 °C) (n=6, C.V.=0,42%)

Estabilidad del complejo coloreado

Para explorar la estabilidad del complejo coloreado las muestras y los patrones de todos los puntos de la curva de calibración fueron analizados inmediatamente

después de formado el complejo coloreado así como también, después de 6, 12 y 24 horas posteriores a la formación del complejo y mantenidas a temperatura ambiente. No se presentó diferencia significativa entre las absorbancias.

Validación del método

Selectividad

Se comprobó que el método propuesto es selectivo (ver Tabla 1), ya que permite medir el analito de interés (bromhexina) de forma inequívoca en presencia de las sustancias que forman la matriz de excipientes. El porcentaje de discrepancia se estableció en un valor inferior al 4 %.

Linealidad y rango

La curva de calibración, absorbancia en función de la concentración, resultó lineal en el rango de 2 a 8 mg L⁻¹. Para este intervalo de trabajo el coeficiente de correlación (*r*) fue de 0,9985 lo que me indica una buena linealidad del sistema. Ya que (*r*) por si solo no justifica la linealidad utilizamos el coeficiente de determinación (*r*²) obteniéndose un valor de 0,998 que indica una fuerte relación entre las variables. El valor de la pendiente 21,3780 indica la sensibilidad del método.

Precisión

Para comprobar la variabilidad del método de ensayo, se evaluó la repetibilidad del sistema instrumental y del método y se reportan los resultados como coeficientes de variación (C.V.) siendo el valor establecido inferior al 2% y los intervalos de confianza, basado en el estadístico de la *t-student*, para la precisión del método (ver Tabla 1). El C.V. global para la precisión intermedia (ver Tabla 2), demostró ser mucho más bajo al establecido (2 veces el C.V. de la repetibilidad del método).

Exactitud

Para determinar la exactitud del ensayo aplicado a la MP, se procedió a comparar los resultados del método propuesto contra los obtenidos con el método oficial potenciométrico reportado en la BP 88 para un criterio de aceptación del 99-101%, indicando que no hay diferencia significativa. La recuperación encontrada en las muestras de jarabe y elixir enriquecidas con los patrones de trabajo resultaron ser satisfactorias ya que se encuentran dentro del criterio establecido para formulados farmacéuticos líquidos, esto es 97-103%. Estos resultados se indican en la Tabla 1 y señalan la buena exactitud del método propuesto.

TABLA 1
Resultados del ensayo de validación de la bromhexina

Criterios de validación	Rango de concentración	Resultados		
Selectividad: (k = 1; j = 6; n = 12) (% discrepancia, no > 4 %)	4,0 (mg L ⁻¹)	< 2,4 %		
Linealidad: k = 7; j = 3; n = 21	2,0 - 8,0 (mg L ⁻¹); y = 21,3780 + 0,187 x; r ² = 0,9980			
Precisión:				
a) Repetibilidad del sistema k = 1; j = 6; n = 6; (C.V < 2 %)	Para 4 mg L ⁻¹ ; \bar{x} = 0,1837; C.V = 0,75 %			
b) Repetibilidad del método k = 3; j = 3; n = 9; C.V (%) ; intervalo de confianza (I.C) ; (p = 0,005); concentración en (mg L ⁻¹)	Conc.	MP	Jarabe	Elixir
	2	\bar{x} = 1,980 C.V = 0,65 I.C (1,93 ; 2,03)	\bar{x} = 1,935 C.V = 0,67 I.C (1,88 ; 1,99)	\bar{x} = 1,942 C.V = 0,71 I.C (1,89 ; 2,00)
	4	\bar{x} = 3,995 C.V = 0,66 I.C (3,88 ; 4,10)	\bar{x} = 3,956 C.V = 0,0072 I.C (3,84 ; 4,07)	\bar{x} = 3,986 C.V = 0,63 I.C (3,89 ; 4,08)
	8	\bar{x} = 7,930 C.V = 0,69 I.C (7,70 ; 8,15)	\bar{x} = 7,968 C.V = 0,75 I.C (7,72 ; 8,20)	\bar{x} = 7,989 C.V = 0,70 I.C (7,76 ; 8,21)
c) Precisión intermedia C.V (%) ; k = 3; j = 3; n = 9; 3 días ; instrumento A y B, analista 1 y 2	C.V = 0,82 %	C.V = 0,77 %	C.V = 0,81 %	

Exactitud:				
Recuperación (%) ; C.V (%) ; Concentración (mg L ⁻¹) ; k = 3; j = 3; n = 18	Cantidad endógena	Cantidad adicionada	Cantidad encontrada	Recuperación / C.V
Jarabe	4	2	4 ± 0,5	100,1; (0,56)
		3		100,8; (0,60)
Elixir	4	2	4 ± 0,2	99,2; (0,72)
		3		100,3; (0,66)
		4		99,8; (0,68)

TABLA 2
Precisión intermedia para la determinación de la bromhexina

		Materia prima		
		Día 1	Día 2	Día 3
Instrumento A	Analista 1	\bar{x} = 3,989 C.V = 0,75	\bar{x} = 3,985 C.V = 0,80	\bar{x} = 3,983 C.V = 0,79
	Analista 2	\bar{x} = 3,979 C.V = 0,91	\bar{x} = 3,969 C.V = 0,60	\bar{x} = 3,954 C.V = 0,70
Instrumento B	Analista 1	\bar{x} = 3,959 C.V = 0,87	\bar{x} = 3,975 C.V = 0,75	\bar{x} = 3,919 C.V = 0,89
	Analista 2	\bar{x} = 3,968 C.V = 0,72	\bar{x} = 3,985 C.V = 0,83	\bar{x} = 3,966 C.V = 0,92
Coeficiente de variación global a concentración de 4 mg L ⁻¹		C.V = 0,82 %		

		Jarabe		
		Día 1	Día 2	Día 3
Instrumento A	Analista 1	\bar{x} = 3,962 C.V = 0,95	\bar{x} = 3,952 C.V = 0,75	\bar{x} = 3,97 C.V = 0,65
	Analista 2	\bar{x} = 3,952 C.V = 0,74	\bar{x} = 3,955 C.V = 0,83	\bar{x} = 3,96 C.V = 0,70
Instrumento B	Analista 1	\bar{x} = 3,923 C.V = 0,83	\bar{x} = 3,942 C.V = 0,69	\bar{x} = 3,954 C.V = 0,71
	Analista 2	\bar{x} = 3,929 C.V = 0,82	\bar{x} = 3,939 C.V = 0,78	\bar{x} = 3,960 C.V = 0,81
Coeficiente de variación global a concentración de 4 mg L ⁻¹		C.V = 0,77 %		

		Elixir		
		Día 1	Día 2	Día 3
Instrumento A	Analista 1	\bar{x} = 3,984 C.V = 0,85	\bar{x} = 3,982 C.V = 0,72	\bar{x} = 3,982 C.V = 0,98
	Analista 2	\bar{x} = 3,924 C.V = 0,72	\bar{x} = 3,992 C.V = 0,81	\bar{x} = 3,972 C.V = 0,86
Instrumento B	Analista 1	\bar{x} = 3,974 C.V = 0,95	\bar{x} = 3,988 C.V = 0,75	\bar{x} = 3,976 C.V = 0,77
	Analista 2	\bar{x} = 3,984 C.V = 0,84	\bar{x} = 3,985 C.V = 0,78	\bar{x} = 3,987 C.V = 0,73
Coeficiente de variación global a concentración de 4 mg L ⁻¹		C.V = 0,81 %		

\bar{x} : media aritmética
C.V: coeficiente de variación

Aplicación analítica

El método fue aplicado satisfactoriamente a la determinación de bromhexina bajo las formas farmacéuticas de jarabe y elixir, las cuales contenían bromhexina como único componente activo. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y confirman que el método propuesto puede ser fácilmente usado para el análisis de rutina de la bromhexina bien como materia prima o en formulaciones farmacéuticas.

TABLA 3
Análisis de muestras farmacéuticas

Muestras	Cantidad declarada	Encontrados	
		Propuestos	Referencias
Materia Prima	99,72%	99,93%	Potenciométrico * 99,7%
Bexilón jarabe	4 mg /5 mL	3,95 ± 1,2 (99,35)	(HPLC) Ref** 3,98 ± 0,5
Brontol elixir	4 mg /5 mL	3,98 ± 1,6 (99,75)	(HPLC) Ref** 3,98 ± 0,2

* BP 1988

** Rauha et. al., 1996

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El método espectrofotométrico, basado en la reacción de Bratton-Mashall fue exitosamente aplicado y validado para la cuantificación de bromhexina en formas farmacéuticas líquidas, donde se comprobó que la presencia de conservadores derivados del parabeno (PHBM y PHBP) y los colorantes no interfieren. El ensayo proporciona un método de control rutinario dentro del control de calidad en la industria farmacéutica ya que es francamente simple, de bajo costo y menor tiempo consumido.

Como recomendaciones se plantea seguir en la búsqueda de reactivos cromóforos que sean menos

tóxicos y más económicos. Así como también, se requiere verificar que la recuperación se logra al considerar las impurezas y los productos de degradación, ya que Gober et al, (1988) reportaron el aislamiento de muy pequeñas cantidades de tres productos de degradación de la bromhexina. Esto último es muy importante para los ensayos de estabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.E.F.I., Marzo 2001. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (Sección Catalana). Monografías. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona. España. P. 46-125.

Argekar, AP. and Powar, SG. 1998. **Simultaneous determination of salbutamol sulfate and bromhexina hydrochloride in formulations by quantitative thin-layer chromatography.** *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*. Vol. 11(4): 254-257.

Berzas, J., Castañeda, G. and Guzmán, F. 2001. **Simultaneous determination of sulfamethoxy-pyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and their associated compounds by liquid chromatography.** *Analytica Chimica Acta*. 442: 241-248.

Bratton A. C., Marshall, E. K. Jr. 1939. **A new coupling component for sulfanilamide determination.** *J. Biol. Chem.*, 128: 537 - 550

British Pharmacopoeia. 1988. Vol. I. Her Majesty's Stationery Office. London. England. P.78.

Bye, A. and Fox, A. 1974. **Modification of an automated method for measurement of sulfamethoxazole and its major metabolite in biological fluids.** *Clin. Chem.* Vol. 20(2): 288-293.

Carda, S., García, M., Simó, E. and Esteve, J. 1997. **Micellar liquid chromatographic determination of diuretics by diazotization and coupling with the Bratton-Marshall reagent.** *Analytica Chimica Acta*. 353: 215-226.

Cárdenas, H. y Cortés, A. 1996. **Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos.** Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Chu, KO. and Tin, KC. 1998. **Analysis of antihistamines in cough syrup.** *Analytical Letters*. 31(11): 1879-1890.

Dias, A., Santos, J., Lima, J. and Zagatto, E. 2003. **Multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of bromhexine.** *Analytica Chimica Acta*. 499: 107-113.

European Pharmacopoeia. 1997. Council of Europe Strasbourg. P.491- 492.

Fox, J. 1979. **Kinetics and mechanisms of the Griess reaction.** *Analytical Chemistry*. Vol. 51(9): 1493-1502.

Fox, Marye y Whitesell, James K. 2000. *Química Orgánica*

(2da.ed.) Editorial Addison Wesley Longman. México.

Gober, B., Lisowski, H. and Franke, P. 1988. **The stability of bromhexine and the structure of its degradation products.** *Pharmazie*. Vol. 43(1): 23-26.

Helman, J. (Comp.). 1982. *Farmacotecnia teoría y práctica*. Continental. México.

ICH. 29 November 1995. International Conference on Harmonization. **Note for Guidance on Validation of Analytical Methods**

Litter, M. 1980. **Manual Litter Farmacología** (6ª ed.) El Ateneo. Argentina. P.891-905.

Martindale, Pharmaceutical Press. 2002. **The Complete Drug Reference**. (33ª ed). Sean C Sweetman. P.1085.

Morrison, R.T. y Boyd, R.N. 1973. *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano, S.A. Massachusetts, EE.UU. (versión española 3ª ed).

Okamoto, H., Nakajima, T., Ito, Y., Aketo, T., Shimada, K. and Yamato, S. 2005. **Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 37 (3): 517-528.

Rao, SVMM., Rao, IN., Reddy, TRS., Sastry CSP. 2005. **Assay of bromhexina hydrochloride in pharmaceutical formulations by extraction spectrophotometry.** *Indian Journal of Chemical Technology*. 12(2): 170-174.

Rauha, JP., Salomies H. and Aalto, M. 1996. **Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and methyl and propyl p-hydroxybenzoate and determination of dextromethorphan hydrobromide in cough-cold syrup by high-performance liquid chromatography.** *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15: 287-293.

Santorio M., Dos Santos M., and Magalhães J. 1984. **Spectrophotometric determination of bromhexine hydrochloride in pharmaceutical preparations.** *J. Assoc. off. Anal. Chem.* Vol. 67(3): 532-534.

Spilva, A y Muktans, Y. 2004. **Guía Spilva de las Especialidades Farmacéuticas** (XXVIIIª ed.). Caracas. P.850-864

Sumarlik, E. and Indrayanto, G. 2004. **TLC densitometric determination of bromhexina hydrochloride in pharmaceuticals, and its validation.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 27(13): 2047-2056.

The United States Pharmacopoeia 27. 2004. The National Formulary 22. The United States Pharmacopoeia Convention INC. Rockville.

Vila, J. (Comp.). 1995. **Tecnología Farmacéutica. II. Forma Farmacéutica**. Síntesis. Madrid, España. P.25-43.