

Validación de las metodologías analíticas por HPLC para la certificación de patrones secundarios de ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno

*Jaime H. Rojas**¹

*Carmen Cecilia Becerra***

*Javier Parra V.**

*Wilmer Ochoa B.**

Resumen

Se presentan en este artículo los resultados obtenidos durante el desarrollo y validación de una metodología analítica para el control de calidad de ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno al estado de materias primas y su posterior certificación como estándares secundarios. El método cromatográfico (HPLC) en fase inversa emplea como fase móvil una mezcla de agua ajustada a pH 2.5 y acetonitrilo (50:50), columna C₁₈ y detección ultravioleta. El método validado se aplicó satisfactoriamente a cada una de las tres sustancias para su calificación y posterior certificación.

Palabras clave: Ibuprofeno - Naproxeno - Ketoprofeno - Cromatografía líquida - C₁₈ - Desarrollo - Validación.

Summary

Validation of a high performance liquid chromatography method for certification of ibuprofen, naproxen and ketoprofen as secondary standars

A reverse high performance liquid chromatography method was developed for the certification of raw material ibuprofen, naproxen and ketoprofen as secondary standars. These raw materials were previously identified and submitted to different control assays,

Recibido para evaluación: Noviembre de 2001

Aprobado para publicación: Diciembre de 2001

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá, D. C., Colombia.

** Instituto de Vigilancia y Control de Medicamentos INVIMA.

¹ E-mail: jairoja@ciencias.ciencias.unal.edu.co

according official and non official quality control methods. The method was validated and then applied to the assay of the substances. A C₁₈ column was used as stationary phase and the detection was performed in the UV region. A mixture of acidic water (pH 2.5) and acetonitrile (50:50) was used as the mobil phase. Finally, the validated method was applied in the assay of the substances for the certification purposes.

Key words: Ibuprofen – Naproxen – Ketoprofen - High performance liquid chromatography - C₁₈ - Development - Validation.

Introducción

El ibuprofeno, el naproxeno y el ketoprofeno son analgésicos antiinflamatorios no esteroides que pertenecen al grupo de derivados del ácido propiónico útiles y eficaces para el tratamiento asintomático de artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y artritis gotosa aguda. También se emplean como analgésicos, para la tendinitis, bursitis aguda y en dismenorrea primaria (1). En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo y validación de un método de análisis para ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno por HPLC en fase inversa, empleando una columna de octadecilsilano y detección por espectrofotometría ultravioleta.

Parte experimental

Equipos

Cromatógrafo para líquidos Merck Hitachi LaChrom, detector UV L-7400, Bomba L-7100, Horno L-7351, Integrador D-7500, Columna C18 Lichrospher 100 x 3.9 mm, 5 µm, Inyector 20µL.

Reactivos

Estándares primarios USP de ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno, materias primas de ibuprofeno (98,95%), naproxeno (99,30%) y ketoprofeno (100,03%), acetonitrilo HPLC Mallinckrodt, agua HPLC, ácido fosfórico RA, titrisol de NaOH 1N, titrisol de HCl 1N. Las

materias primas ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno fueron controladas de acuerdo a la USP(2) o la BP (3), realizando entre otros los siguientes ensayos: identificación (UV, IR), humedad, rango de fusión, residuo a la ignición, metales pesados, pureza cromatográfica, pureza y rotación específica cuando correspondiera.

Como soporte para este tipo de estudios, se recomienda consultar en el portal de la FDA la siguiente dirección: /guidance/ 2396dft.pdf

Optimización del sistema cromatográfico

Durante el proceso de selección de la fase móvil y siguiendo recomendaciones de la literatura se estudiaron diferentes fases móviles compuestas esencialmente por acetonitrilo y agua ajustada a determinados valores de pH con ácido fosfórico. Luego de realizar algunos cambios a nivel de pH, flujo de fase móvil, temperatura y porcentaje de acetonitrilo, se establecieron las mejores condiciones del sistema cromatográfico para cada uno de los analitos, condiciones tendientes a la obtención de señales con tiempos de retención adecuados y simetría aceptable (Tabla 1). En cada caso se utilizó detección al ultravioleta a una longitud de onda acorde con los espectros de absorción de los compuestos en la fase móvil.

Estudios de estabilidad

Para verificar la selectividad del sistema cromatográfico, muestras de ibuprofeno, naproxeno y

Tabla 1. Condiciones estandarizadas para ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno.

Condiciones	Ibuprofeno	Naproxeno	Ketoprofeno
Acetonitrilo: Agua pH 2.5	50 : 50	50 : 50	50 : 50
Flujo (mL/min)	2,5	1,5	1,0
Temperatura (°C)	30	35	35
Longitud de onda (nm)	263	271	255

ketoprofeno se sometieron a reflujo durante 1 hora con agua, HCl 1N, NaOH 1N y H₂O₂ al 1%. Igualmente se realizaron estudios a 105 °C y a la acción directa por 2 horas de luz UV de longitud de onda corta y larga. Las suspensiones resultantes fueron filtradas, disueltas en la fase móvil y sometidas al análisis por HPLC.

Resultados y discusión

Las diferentes fases móviles constituidas por acetonitrilo y agua ajustada ésta a diferentes valores de pH con ácido fosfórico presentaron resultados variables a diferentes valores de flujo y temperatura, en algunos casos con tiempos de retención elevados y señales asimétricas. Una fase móvil conformada por acetonitrilo-agua (50:50) a pH 2,5 presentó los mejores resultados, si bien con valores de flujo diferentes para cada sustancia (4). En la Tabla 2 se presentan los resultados para la idoneidad del sistema cromatográfico para cada analito.

Los valores de resolución se determinaron frente a la propiofenona para el ibuprofeno, al ácido benzoico para el naproxeno y al ácido 2-benzoilbenzoico para el ketoprofeno, sustancias de estructura similar a la de los analitos. En todos los casos la separación fue de 100%. El ácido benzoico se encuentra reportado por Wang y Zou como estándar interno para la determinación de naproxeno (5). Los tiempos de retención para el ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno fueron respectivamente de 3,47, 2,16 y 3,13 minutos.

Validación de la metodología analítica

Selectividad

La selectividad del método con la fase móvil óptima se analizó además frente a los productos de descomposición obtenidos por hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y exposición a la luz, así como frente a las sustancias utilizadas para el cálculo de la retención.

Tabla 2. Parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico.

Sustancia	k	N	Asimetría	Resolución
Ibuprofeno	6,89	2071	1,36	5,41
Naproxeno	2,72	531	1,05	2,94
Ketoprofeno	2,67	904	1,07	1,76

En los ensayos de degradación forzada para el ibuprofeno solamente se observó una segunda señal a 5,58 minutos en el caso de H_2O_2 , lo cual indica bien la estabilidad del fármaco o que los productos de descomposición no interfieren en las condiciones de la determinación, confirmándose la selectividad de la metodología. En el caso de la degradación con NaOH no se observó ningún tipo de señal aún en los ensayos de cromatografía en capa delgada. En esta técnica se observó una mancha de menor valor de Rf respecto del ibuprofeno.

Para el caso del naproxeno se obtuvieron resultados similares con un producto de descomposición en H_2O_2 de tiempo de retención a 3.26 minutos y con dos manchas en cromatografía en capa delgada. En NaOH no se observaron señales de descomposición.

Para el caso del ketoprofeno se observaron en todos los casos señales cromatográficas que no interferían con la señal del fármaco y ninguna señal en el caso del NaOH. En cromatografía en capa delgada se observaron señales de descomposición principalmente en H_2O_2 (cuatro

manchas) y en NaOH y ninguna de ketoprofeno en este último caso.

Los anteriores resultados indican una metodología analítica selectiva para la determinación de los tres fármacos.

Linealidad

La proporcionalidad en la respuesta se verificó con concentraciones entre 100 y 500 mcg/mL para ibuprofeno, entre 20 y 100 mcg/mL para naproxeno y entre 10 y 50 mcg/mL para ketoprofeno. Cada una de las concentraciones anteriores se preparó por triplicado y las inyecciones se realizaron por duplicado. En la Tabla 3 se reportan los límites calculados para intercepto y pendiente en el estudio de linealidad del sistema. Los valores experimentales de t indican convergencia al origen y pendiente significativamente diferente de cero en todos los casos.

Los valores de F experimentales obtenidos en el análisis de varianza de la regresión para cada uno de los fármacos indican regresión altamente significativa y desvío no significativo de la linealidad (Tabla 4).

Table 3. Resultados del test de Student para intercepto y pendiente.

Sustancia	Parámetro	Valor	t exp.	Límite inf.	Límite sup.
Ibuprofeno	Intercepto	1931,08	1,860	-194,661	4056,827
	Pendiente	622,26	199,83	615,884	628,639
Naproxeno	Intercepto	8169,90	0,93	-9814,75	26154,55
	Pendiente	14515,02	109,64	14243,89	14786,15
Ketoprofeno	Intercepto	18377,53	1,245	-11861,06	48616,13
	Pendiente	65075,65	146,18	64163,92	65987,38

Tabla 4. Resultados del ANOVA para la regresión lineal.

Sustancia	Parámetro	F exp.	F tab.
Ibuprofeno	Regresión	36008,89	4,20
	Desvío	0,06	2,99
Naproxeno	Regresión	12021,07	4,20
	Desvío	0,449	2,99
Ketoprofeno	Regresión	21368,12	4,20
	Desvío	0,115	2,99

Repetibilidad, precisión intermedia y exactitud

La precisión a nivel de repetibilidad se evaluó mediante 6 inyecciones de un estándar de cada uno de los tres fármacos. La precisión intermedia se estudió a tres niveles de concentración equivalentes al 50, 100 y 150% respecto de las curvas de calibración, evaluándose a nivel de dos analistas y tres días. Los valores de los coeficientes de variación obtenidos se presentan en la Tabla 5.

El análisis de varianza para la precisión intermedia indicó para cada fármaco influencia no significativa en los resultados a nivel de analista únicamente para ibuprofeno y a nivel de día significativa para las tres sustancias.

El estudio de la exactitud del sistema se realizó a tres niveles de concentración equivalentes al 66,66%, 100,00% y 133,33%, tres series por nivel y réplica para cada una, es decir, un total de

6 determinaciones independientes para cada nivel de concentración. Los resultados conducen a un porcentaje de recuperación promedio de 100,80 para ibuprofeno, 100,46 para naproxeno y 100,04% para ketoprofeno. Los valores de t calculados indican diferencias no significativas respecto del 100%, mientras que los valores de G de la prueba de Cochran indican que los niveles de concentración no influyen en la variabilidad observada.

Solidez

La solidez del método para los tres fármacos se evaluó de acuerdo al diseño de Plackett Burman (6), realizando pequeñas variaciones en algunos parámetros del método (Tabla 6): pH, longitud de onda, porcentaje de acetonitrilo, flujo de la fase móvil, temperatura de la columna, analista y día. Los resultados demuestran que para el ibuprofeno

Tabla 5. Resultados de los ensayos de precisión.

Nivel	Ibuprofeno	Naproxeno	Ketoprofeno
Repetibilidad	0,73%	0,19%	0,31%
Intermedia	0,77%	0,56%	0,63%
	0,58%	—	0,40%
	0,66%	0,85%	0,85%

Tabla 6. Valores y parámetros estudiados en el ensayo de solidez.

Variable	Ibuprofeno		Naproxeno		Ketoprofeno	
pH	2,5	2,8	2,5	2,8	2,5	2,8
λ nm	263	261	271	269	255	253
Porcentaje CH ₃ CN	50	52	50	52	50	52
Flujo mL/minuto	2	1,8	1,5	1,3	1	1,2
Temperatura °C	30	32	35	33	35	33
Analista	1	2	1	2	1	2
Día	1	2	1	2	1	2

el sistema es sólido frente a cambios de pH, temperatura, día y analista. Para el naproxeno el sistema es sólido frente al pH, temperatura de la columna, analista y día. Para el ketoprofeno el sistema es sólido frente a pH, temperatura y porcentaje de acetonitrilo y analista. En la Tabla 6 se indican los valores de las variables estudiadas.

Conclusiones

Se estandarizó un método de análisis por HPLC en fase inversa para la certificación de estándares secundarios de ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno. En la etapa de validación, el método presentó repetibilidad, exactitud, linealidad dentro de los intervalos de concentración estudiados para los tres fármacos y selectividad frente a los posibles productos de descomposición obtenidos en las condiciones de degradación estudiadas. El método puede aplicarse en estudios de estabilidad de los fármacos y adecuarse para su determinación en producto terminado y para ensayos de pureza cromatográfica.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Vigilancia y Control de Medicamentos, Alimentos y Cosméticos

INVIMA por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

Bibliografía

1. Goodman y Gilman, "Las bases farmacológicas de la terapéutica", Novena edición, Editorial Mc Graw Hill, Interamericana, México 1996
2. The United States Pharmacopoeia, USP XXIII NF 18, The United States Pharmacopoeia Convention INC, Rockville USA, 1995.
3. The British Pharmacopoeia, version 2, CD-ROM, Stationery Office Ltd., March 1998.
4. J. J. Parra y W.E. Ochoa, Validación de las metodologías analíticas por HPLC para la certificación de patrones secundarios de ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, 2000.
5. C.X. Wang y G.W. Zou, *Sepu*, **16**, 255 (1998).
6. A.O. Quatrochi, "Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica", Academic Press, San Diego, California, 1997.