

Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de ibuprofeno y tiocolchicosido en comprimidos

M. González^{1*}, M. Bor^{1**}, R. Amaro²

¹Laboratorio de Análisis de Medicamentos. Facultad de Farmacia.
Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

²Centro de Química Analítica. Escuela de Química. Facultad de Ciencias.
Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Development and validation of an analytical method by HPLC for the simultaneous determination of ibuprofen and tiocolchicoside in tablets

Desenvolupament i validació d'un mètode analític per HPLC per a la determinació simultània de ibuprofeno i tiocolchicosido en comprimits

RECEIVED: 18 OCTOBER 2018; ACCEPTED: 19 NOVEMBER 2018

ABSTRACT

It was developed and validated an analytical methodology by HPLC for the simultaneous determination of Ibuprofen and Thiocolchicoside in tablets. The optimal separation conditions were achieved with the Hamilton PRP-1 column (5 μ m, 4.1 x 150 mm) with a mobile phase constituted by methanol: acetonitrile: water (10:20:70)% v / v y 0.05% triethylamine a pH adjustment to 8.0 \pm 0.1 with 85% orthophosphoric acid. The mobile phase flow was 1.3 mL / min, an injection volume of 5 μ L and the wavelength of 260 nm. The methodology presented linearity in the concentration range of 3.0 to 9.0 mg / mL for Ibuprofen and 0.02 to 0.06 mg / mL for Thiocolchicoside, with a coefficient of determination greater than 0.999, accuracy was obtained with a recovery percentage of 99.3 and 99.8% for Ibuprofen and 99.3 and 100.5% for Thiocolchicoside. The presence of degradation products was determined through the analysis of spectral purity, especially when the samples are exposed for 3 days in the presence hydrogen peroxide, and in Ibuprofen in the presence of acid hydrolysis. In the analysis of an expired drug it was demonstrated how the proposed method is able to determine the quantities of active principles present.

Keywords: Ibuprofen; thiocolchicoside; determination; validation; stability indicators.

RESUMEN

Se desarrolló y validó una metodología analítica por HPLC para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicosido en comprimidos. Las condiciones óptimas de separación se lograron con la columna Hamilton PRP-1 (5 μ m, 4,1 x 150 mm) empleando fase móvil constituida por metanol: acetonitrilo: agua (10:20:70) % v/v y 0,05 % de trietilamina a pH a 8,0 \pm 0,1 con ácido ortofosfórico al 85 %. El flujo de fase móvil fue 1,3 mL/min, volumen de inyección de 5 μ L y longitud de onda de 260 nm. La metodología presentó linealidad en el intervalo de concentración de 3,0 a 9,0 mg/mL para Ibuprofeno y 0,02 a 0,06 mg/mL para Tiocolchicosido, con un coeficiente de determinación mayor a 0,999. Se obtuvo exactitud con un porcentaje de recuperación de 99,3 y 99,8 % para Ibuprofeno y 99,3 y 100,5 % para Tiocolchicosido. Se determinó la presencia de productos de degradación a través del análisis de pureza espectral, especialmente cuando se exponen las muestras durante 3 días a la presencia de peróxido de hidrógeno, y en Ibuprofeno en presencia de hidrólisis ácida. En el análisis de un medicamento vencido se demostró como el método propuesto es capaz de determinar las cantidades de principios activos presentes.

*Corresponding author: *maria.igp8@gmail.com;

**marisabel.bor@gmail.com

Palabras claves: Ibuprofeno; Tiocolchicósido; determinación; validación; indicadores de estabilidad.

RESUM

Es va desenvolupar i va validar una metodologia analítica per HPLC per a la determinació simultània de ibuprofeno i tiocolchicósido en comprimits. Les condicions òptimes de separació es van aconseguir amb la columna Hamilton PRP-1 (5 µm, 4,1 x 150 mm) emprant fase mòbil constituïda per metanol: acetonitril: aigua (10:20:70)% v / v i 0,05% de trietilamina a pH a 8,0 ± 0,1 amb àcid ortofosfòric al 85%. El flux de fase mòbil va ser 1,3 ml / min, volum de injecció de 5 ml i longitud d'ona de 260 nm. La metodologia va presentar linealitat en l'interval de concentració de 3,0 a 9,0 mg / ml per ibuprofeno i 0,02-0,06 mg/ml per tiocolchicósido, amb un coeficient de determinació major a 0,999. Es va obtenir exactitud amb un percentatge de recuperació del 99,3 i 99,8% per ibuprofeno i 99,3 i 100,5% per tiocolchicósido. Es va determinar la presència de productes de degradació a través de l'anàlisi de puresa espectral, especialment quan s'exposen les mostres durant 3 dies a la presència de peròxid d'hidrogen, i el ibuprofeno en presència d'hidròlisi àcida. En l'anàlisi d'un medicament vençut es va demostrar com el mètode proposat és capaç de determinar les quantitats de principis actius presents.

Paraules clau: Ibuprofeno; tiocolchicósido; determinació; validació; indicadors d'estabilitat.

INTRODUCCIÓ

Ibuprofeno, químicament denominat àcid (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico (Figura 1-a), és un antiinflamatori no esteroide ampliament utilitzat com a analgèsic i antiinflamatori en el tractament de la osteoartritis i la artritis reumatoide, entre altres malalties¹. Tiocolchicósido o N-[3-(β-Dglucopiranosiloxi)-5, 6, 7,9-tetrahidro-1,2-dimetoxi-10(metil) 9-oxobenzo [a] heptalen-7il] acetamida, (figura 1-b) és un agent relaxant muscular amb accions antiinflamatòries i analgèsiques, és molt utilitzat per al tractament de les espasmes musculars i les trastorns reumatològics, ortopèdics i traumatològics².

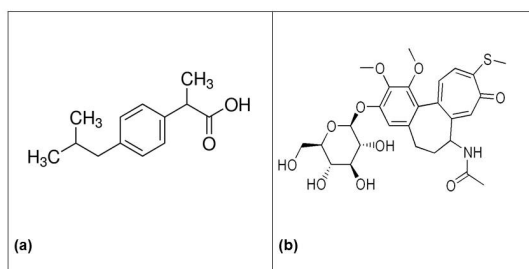


Figura 1. Estructura química de: (a) Ibuprofeno. (b) Tiocolchicósido

Los antiinflamatorios no esteroideos y los agentes relajantes musculares conforman el tratamiento farmacológico del dolor y su combinación brinda una analgesia satisfactoria a la vez que permite aliviar tanto el proceso inflamatorio resultante de la lesión tisular, como el espasmo muscular asociado, lo que se traduce en una recuperación funcional más rápida³.

El método analítico para la determinación simultánea de ambos principios activos no aparece reportada en ninguna de las monografías oficiales, es por ello, que se propuso desarrollar un nuevo método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la determinación simultánea de la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en comprimidos. Una vez desarrollado el método se procedió a su validación. Para que un procedimiento pueda ser validado, es necesario considerar las recomendaciones sugeridas en textos oficiales, entre ellos destaca la USP 38, específicamente en el capítulo <1225> "Validación de los Procedimientos del Farmacopeicos"⁴. Los procedimientos para la validación de métodos analíticos según la USP están directamente relacionados con las pautas establecidas en la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), específicamente en el texto "Validación de procedimientos analíticos: texto y metodología" Q2 (R1)⁵

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la validación de la metodología se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia de la casa comercial Waters, conformado por una bomba modelo 600E, un inyector automuestrador, modelo 717 de Plus, un detector de arreglo de diodos, modelo PDA 996. El cromatógrafo está conectado a un computador con un programa Millennium 32[®]. Para la separación se evaluaron dos columnas: Symmetry C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm) y Hamilton PRP-1 (5 µm, 4,1 x 150 mm). Se emplearon los siguientes solventes grado HPLC: acetonitrilo, metanol y trietilamina. Adicionalmente se utilizó hidróxido de sodio 99%, ácido clorhídrico 37%, ácido o-fosfórico 85% y peróxido de hidrógeno al 35%. El agua utilizada para todos los análisis proviene del equipo de destilación Cascada Ro Waters (Pall Corporation) y purificada en el ultrapurificador de agua Barnstead (Nanopure). Para la fase móvil se partió de mezclas constituida por metanol: acetonitrilo: agua en diferentes proporciones y se agregó 0,05 % de trietilamina como formador de par iónico ajustando el pH de la fase móvil en 8,0 ± 0,1 con ácido ortofosfórico al 85 %. El flujo de fase móvil fue de 1,3 mL/min, el volumen de inyección de 5 µL y la longitud de onda de 260 nm. Las mediciones de pH fueron realizadas con el potenciómetro Orion Research modelo 601 A. Para el tratamiento y disolución de las muestras se empleó una solución diluyente compuesta por una mezcla acetonitrilo y agua en relación 50:50 % v/v. Todas las muestras fueron filtradas antes de ser inyectadas en el cromatógrafo con membranas de filtración de nylon de 0,45 µm millipore.

Patrones

Se emplearon patrones de referencia secundarios de Ibuprofeno (% de pureza=100,6%) y Tiocolchicósido (% de pureza= 100,7 %). Ambos patrones se encontraban vigentes al momento de la investigación

Muestras

Se analizaron 4 muestras comerciales de medicamentos fabricados y distribuidos en Venezuela; tres de ellos vigentes (medicamentos A, C y D) y uno vencido (medicamento B). Todos los medicamentos estudiados declaraban contener 600 mg de Ibuprofeno y 4 mg de Tiocolchicósido por comprimido. Con los medicamentos A, C y D se preparó un material de referencia interno (MRI), ya que no se contaba con material de referencia certificado. El MRI debe ser preparado por el laboratorio para su exclusivo uso interno. El MRI se realizó mezclando homogéneamente 30 tabletas de tres fabricantes distintos, 10 por cada fabricante ⁶. Se elaboró con el propósito de desarrollar un método universal, estableciéndose la identidad del o los fármacos presentes en el medicamento y que permita distinguir entre compuestos con estructuras estrechamente relacionadas que pudieran estar presentes, esta identificación debe ser específica para el o los fármacos, no importando que marca comercial sea el medicamento sino que el método analítico sea capaz de identificar la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido presente en los comprimidos, con la finalidad de ofrecer una metodología universal de calidad, según lo establecido en la USP 38, en el capítulo <2> *Medicamentos orales-Pruebas de calidad de productos* ⁷.

Validación del método cromatográfico

Una vez desarrollada la metodología analítica se procedió a validarla, según la categoría I del apartado <1225> de la USP 38 para la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados ⁴.

Linealidad

Para el estudio de la linealidad la ICH recomienda preparar soluciones de estándar de al menos 5 niveles de concentración, las cuales deben encontrarse en un intervalo mínimo de 80% a 120% de la concentración de referencia; este procedimiento deberá repetirse en tres días diferentes, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema ⁵. Los patrones se prepararon en un rango del 50 a 150% para asegurar así la determinación de la concentración de componentes de los medicamentos en estudio, cada curva estuvo compuesta por cinco concentraciones diferentes de patrones, ubicadas en un rango aproximado de 3,0 a 9,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,02 a 0,06 mg/mL de Tiocolchicósido, con estos valores se construyeron las curvas de calibración y se determinó el coeficiente de determinación de la mismas.

Especificidad

La especificidad es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes

de la matriz ⁴. En el caso del análisis de un fármaco, resulta de gran utilidad contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación ⁴. Al no contar con este último, fue necesario realizar un ensayo de degradación artificial que consistía en pesar el equivalente a 150 mg de ibuprofeno y 1 mg de tiocolchicósido (1/4 de peso promedio del MRI) en un balón de 10,00 mL y se sometió a cada una de las siguientes condiciones de degradación forzada durante 3 días:

Muestra control: No se le realizó ningún tratamiento previo.

Fotólisis: se expuso a radiación visible

Hidrólisis ácida: se le añadió 1,00 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1N

Hidrólisis básica: se le añadió 1,00 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1N

Oxidación: se le añadió 1,00 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 35 %

Termólisis: se sometió la muestra a calentamiento en un baño de vapor durante 3 horas a una temperatura de 60 °C.

Una vez concluido el tiempo de exposición se enrasaron las muestras con solución diluyente, posteriormente se centrifugó por 10 minutos, separando la fase líquida de los residuos sólidos, se tomó del sobrenadante 4 mL de muestra y se diluyó a 10 mL con solución diluyente. Adicionalmente se preparó un patrón combinado al 100% en concentración 6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Tiocolchicósido. La muestra control, que fue preparada, analizada y luego se dejó en reposo durante 3 días, para ser de nuevo analizada a fin de evaluar la degradación de la solución de análisis del medicamento con el tiempo. Este análisis se completó con el estudio de pureza del pico cromatográfico correspondiente a cada analito.

Precisión

La precisión del método fue evaluada mediante las determinaciones de repetibilidad y precisión intermedia. La precisión debe ser determinada analizando un número suficiente de muestras, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) ⁴.

Precisión de sistema cromatográfico.

Se evaluó inyectando cinco veces una disolución patrón combinada que contenía 6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Tiocolchicósido. Y se calculó el respectivo coeficiente de variación, tanto para las áreas como para los tiempos de retención, utilizando la ecuación 1.

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Donde s corresponde a la desviación estándar y x al promedio del área bajo la curva de las determinaciones.

Repetibilidad.

Se evaluó mediante la preparación de 6 muestras al 100 % (6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Tiocolchicósido), las cuales fueron preparadas tal como se especifica en la preparación del MRI, cada

muestra se inyectó por duplicado en el cromatógrafo. A partir de las áreas obtenidas con estas muestras y una curva de calibración preparada ese día se determinó el valor promedio y el coeficiente de variación de la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en (mg/comprimido).

Precisión intermedia.

La precisión intermedia se puede evaluar realizando variaciones en alguna de las siguientes condiciones días, analistas y equipos ⁴. En esta investigación, se estudió la precisión intermedia en diferentes días. Para ello se prepararon 3 muestras al 100 % (6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Tiocolchicósido), tal como se especifica en la preparación del MRI, cada muestra se inyectó por duplicado en el cromatógrafo. A partir de las áreas obtenidas con estas muestras y una curva de calibración preparada en cada día se determinó el valor promedio y el coeficiente de variación de la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en mg/comprimido.

Exactitud

Para la exactitud se empleó el método de patrón añadido a una muestra que se le ha determinado su concentración. Para lograrlo el MRI se contaminó con una cantidad determinada de un patrón de concentración conocida y se determinó el porcentaje de recuperación. Para realizar la exactitud se preparan soluciones de muestras enriquecidas a tres niveles de concentración diferentes, los valores sugeridos son 50-80, 100 y 120-150 % de la concentración normal de trabajo. Recomiendan preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración ⁴. Finalmente se calcula el porcentaje de recuperación como medida de la exactitud con la ecuación (2).

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{(\text{Conc. muestra enriquecida} - \text{Conc. muestras enriquecer})}{\text{Conc. estándar}} \times 100$$

(2)

Se prepararon muestras por triplicado en un rango de concentración de 75, 100 y 125%, para cada nivel de concentración. Las concentraciones de las muestras fueron calculadas utilizando una curva de calibración realizada el mismo día.

Robustez

Se debe evaluar la robustez del método con una serie de parámetros de idoneidad del sistema, con la finalidad de asegurar que se mantiene la validez del procedimiento analítico utilizado ⁴. Los parámetros establecidos para la evaluación de la robustez del método fueron el flujo de la fase móvil, pH de la fase móvil y composición del disolvente orgánico (% metanol). El empleo del diseño de la matriz de Plackett y Burman, permitió estudiar el efecto que tienen las variables seleccionadas cuando han sido modificadas ligeramente.

Luego se comprueba si existe influencia significativa sobre el resultado con la ecuación (3).

$$\text{Si } |V_B| > s\sqrt{2} \Rightarrow \text{Diferencia significativa} \quad (3)$$

Donde V_B es el módulo de la diferencia y s es la desviación estándar ⁹.

Determinación del contenido de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en medicamentos de diferentes marcas comerciales

Una vez desarrollado y validado el método analítico por HPLC, se procedió a determinar la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en los medicamentos A, B, C y D. La importancia de estudiar el medicamento B radica en evaluar si el método es capaz de demostrar la composición del medicamento una vez vencido. Para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido, se estableció como criterio de aceptación un porcentaje respecto a lo declarado entre 90 - 110 %, obtenida a partir de la relación entre la cantidad del analito encontrada y lo declarado por el fabricante del medicamento por 100 ⁴.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo del método de separación

Para la evaluación de las condiciones cromatográficas se utilizaron los patrones de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en concentraciones de 6,0 mg/mL y 0,04 mg/mL respectivamente.

Para la optimización del método de separación se consideró primeramente las propiedades ácido-base de los compuestos en estudio, es así que el Ibuprofeno contiene dos grupos funcionales carboxilos con un pKa de 4,91 y el Tiocolchicósido contiene un grupo funcional amino con un pKa de 12,74, lo que puede permitir la separación de estos compuestos con el ajuste de pH en la fase móvil.

Tomando en consideración el efecto del pH se partió de una fase móvil que contiene metanol: acetonitrilo: agua (25:15:60) % v/v a un pH=8,0 dado que con este pH se asegura que ambas especies estén en su forma orgánica no disociada. En la figura 2-a se muestra el cromatograma obtenido con esta fase móvil y se puede apreciar la banda correspondiente a Tiocolchicósido en 2,60 minutos e Ibuprofeno en 12,34 minutos con un tiempo total de corrida de 22 minutos. Debido a la alta dispersión de la banda del ibuprofeno se consideró el uso de un formador de par iónico, para mejorar la retención y disminuir la polaridad de esta especie ácida.

El principio de la cromatografía de par iónico es agregar un compuesto iónico a la fase móvil que aporte un contraión de carga opuesta a la del analito de interés, para las muestras que contienen ácidos carboxílicos el contraión ideal tiene grupos amino. Para este caso se utilizó como agente formador de par iónico la trietilamina (TEA). En la figura 2-b se muestra el cromatograma de patrón combinado de ibuprofeno y tiocolchicósido, utilizando una fase móvil compuesta por metanol: acetonitrilo: agua (10:20:70) % v/v, 0,05 % TEA y pH 8,0. Aunque se obtiene una mejora significativa en la forma del pico de ibuprofeno este sigue teniendo una larga cola.

Una de las grandes desventajas que tienen las columnas de fase unida químicamente en soportes de sílica es que los grupos siloxanos de la superficie cubiertos por sililación se limita a 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ o menos a causa de los efectos estéricos. Los grupos SiOH que no han reaccionado, desafortunadamente proporcionan una polaridad indeseable a la superficie, lo que originan picos cromatográficos con cola. Existen en el mercado columnas en base poliméricas que se comportan de manera similar a las columnas de fase unida químicamente pero sin su polaridad indeseable como por ejemplo las PRP fabricadas de poliestireno-divinil benceno. Estas columnas tienen además la gran ventaja de poder trabajar a pH entre 1 y 13 lo que permiten aumentar su selectividad significativamente.

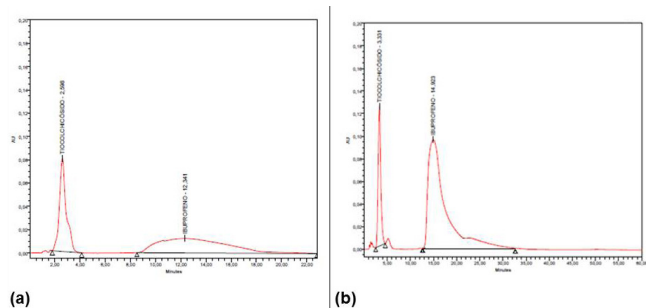


Figura 2. Cromatogramas correspondientes al patrón combinado de Tiocolchicosido e Ibuprofeno utilizando la fase móvil: acetonitrilo: metanol: agua en la proporción: (a) (25:15:60) % v/v y (b) (10:20:70) con 0,05% de TEA, ambos a pH 8,0 y flujo 1,0 mL/min, en columna Symmetry C18 (5 μm , 150 x 4,6 mm)

La figura 3-a se presenta el cromatograma obtenido inyectando las muestras en una columna Hamilton PRP-1 (5 μm , 4,1 x 150 mm), la fase móvil está constituida por metanol: acetonitrilo: agua (10:20:70) % v/v, 0,05 % TEA a pH 8. El flujo fue ajustado de 1,0 a 1,3 mL/min para disminuir el tiempo de retención de ambos componentes. Este cromatograma muestra un pico más simétrico para el ibuprofeno, una buena separación entre Tiocolchicosido e Ibuprofeno con $R_s = 3,64$ y un tiempo de análisis total de 10 minutos.

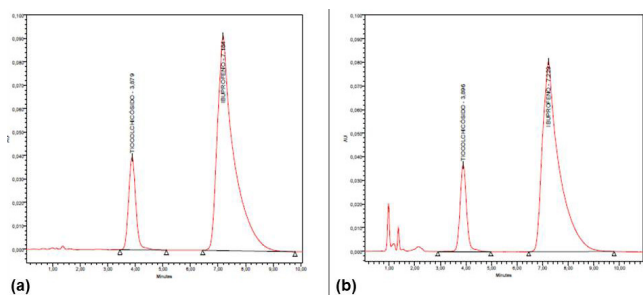


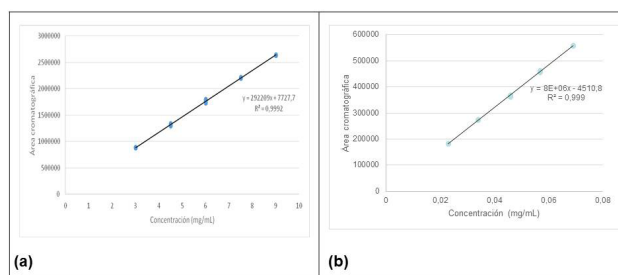
Figura 3. Cromatogramas correspondientes a: (a) patrón combinado de Tiocolchicosido e Ibuprofeno (b) muestra. Utilizando la fase móvil: acetonitrilo: metanol: agua (10:20:70) % v/v y 0,05 % TEA y pH 8,0 con flujo de 1,3 mL/min en columna Hamilton PRP-1 (5 μm , 150 x 4,1 mm).

Validación del método

En la figura 3-b se presenta el cromatograma de la muestra, preparada a una concentración equivalente de Ibuprofeno 6,0 mg/mL y Tiocolchicosido 0,04 mg/mL. Se puede observar que no existe interferencia entre los excipientes y los principios activos presentes en la muestra.

Linealidad

Se realizó una curva de calibración con cinco niveles de concentración, para el Ibuprofeno 3,004, 4,505, 6,007, 7,509, 9,011 mg/mL. En la gráfica 1-a se muestra la curva de calibración obtenida en función del área total de las señales cromatográficas frente a la concentración del patrón de Ibuprofeno, la cual corresponde a una línea recta con ecuación: $y = 292209x + 7727,7$ con un $R^2 = 0,9992$ indicando que existe una relación lineal. Los niveles de concentración para el Tiocolchicosido son 0,023, 0,034, 0,045, 0,056, 0,068 mg/mL. En la gráfica 1-b se muestra la curva de calibración obtenida en función del área total de las señales cromatográficas frente a la concentración del patrón de Tiocolchicosido, la cual corresponde a una línea recta con ecuación: $y = 9E+06x - 10547$ con un $R^2 = 0,9996$ indicando que existe una relación lineal.



Gráfica 1: Curva de calibración para patrones de: (a) Ibuprofeno (b) Tiocolchicosido. Ajuste de mínimos cuadrados

Especificidad

Las muestras sometidas a degradación forzada fueron analizadas y los resultados obtenidos se compararon con patrón y muestra control. Se puede observar que ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, ya que se puede confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), en todos los casos el PA es menor al TH.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos luego de aplicar las pruebas de degradación forzada a los dos principios activos. Se puede observar que para las condiciones de muestra en reposo por 3 días, fotólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y termólisis el porcentaje de degradado es menor al 20 % de la concentración inicial, que es lo recomendado para que no exista interferencia significativa⁸, lo que nos indica que esos degradados no interfieren con nuestras señales de interés, dando la condición de especificidad al método, que a pesar de la degradación no existen señales superpuestas sobre esas señales. Sin embargo, para la condición de oxidación se observa para Ibuprofeno un porcentaje de degradado de 20,3 %, existiendo una pequeña interferencia y para el caso de Tiocolchicosido no se observó presencia de señal,

Tabla 1 Especificidad del método para la determinación de Tiocolchicósido e Ibuprofeno

Condición	Tiocolchicósido (TIO)					Ibuprofeno (IBU)				
	PA	TH	C _{TIO} (mg/comp)	% respecto a lo declarado	% degradado	PA	TH	C _{IBU} (mg/comp)	% respecto a lo declarado	% degradado
Muestra control	0,673	1,141	4,28	107,0	0,039	1,017	593,9	99,0
Muestra (3 días)	0,651	1,124	4,37	109,3	-2,1	0,042	1,015	617,9	103,0	-4,1
Fotólisis	0,860	1,175	3,61	90,3	15,7	0,041	1,018	612,9	102,2	-3,2
Hidrólisis ácida	0,557	1,140	4,16	104,0	2,8	0,030	1,018	508,4	84,7	14,4
Hidrólisis básica	0,742	1,166	4,15	103,8	3,0	0,043	1,016	625,1	104,2	-5,3
Oxidación	0,043	1,037	473,1	78,9	20,3
Termólisis	0,656	1,134	3,97	99,3	7,2	0,037	1,016	600,9	100,2	-1,2

PA= Ángulo de pureza | TH= Ángulo del umbral | % respecto a lo declarado_{TIO}= 4mg/comp
% respecto a lo declarado_{IBU}= 600mg/comp

Tabla 2 Repetibilidad en la determinación de Tiocolchicósido e Ibuprofeno.

muestras	C _{IBU} encontrada (mg/comp)	% respecto a lo declarado	C _{TIO} encontrada (mg/comp)	% respecto a lo declarado
1	596,0±0,7	99,3%	4,00	100,0%
2	592,0±1,8	98,7%	3,90	97,5%
3	605,0±1,2	100,1%	3,90	97,5%
4	587,0±1,5	97,8%	3,90	97,5%
5	601,0±1,8	100,2%	4,00	100,0%
6	585,0±1,0	97,5%	3,80	95,0%
Promedio	594,0	99,0%	3,91	97,8%
% CV	1,3		1,12	

CV= Coeficiente de variación | Comp=comprimido

Tabla 3 Precisión intermedia del método para la determinación de Tiocolchicósido e Ibuprofeno.

Réplica de muestra	Réplica de inyección	Cantidad de Tiocolchicósido (mg/comp)			Cantidad de Ibuprofeno (mg/comp)		
		Día 1	Día 1	Día 2	Día 3	Día 2	Día 3
1	1	4,09	609	581	596	3,95	4,07
	2	4,03	606	583	589	3,99	4,01
2	1	4,11	604	594	603	3,90	4,04
	2	4,15	621	598	617	3,98	4,07
3	1	4,04	601	586	604	3,89	4,04
	2	4,03	599	600	609	3,96	4,05
Promedio		4,08	3,95	607	590	603	4,05
Desviación estándar		0,05	0,04	8	8	10	0,02
% CV		1,22	1,05	1,3	1,4	1,6	0,56

CV= Coeficiente de variación | Comp=comprimido

por lo que los principios activos en estudio se degradan en presencia de peróxido de hidrógeno al 35% en exposición de 3 días. También se puede observar que para Ibuprofeno en presencia de hidrólisis ácida y peróxido de hidrógeno existe una disminución en el porcentaje de recuperación respecto a lo declarado, sin encontrarse dentro de los límites de aceptación, lo que indica que Ibuprofeno sufrió degradación bajo estas condiciones. De igual manera, el método es espe-

cífico, ya que permite evaluar de manera inequívoca los principios activos en estudio.

Precisión

Repetibilidad. Los resultados obtenidos en cuanto a la repetibilidad se encuentran en la tabla 2, obteniéndose para Ibuprofeno un valor de 594,0 mg/comprimido con coeficiente de variación de 1,3 % y para Tiocolchicósido 3,91 mg/comprimidos, con un

Tabla 4 Exactitud expresada como porcentaje de recuperación de Tiocolchicósido e Ibuprofeno

Nivel de concentración	Tiocolchicósido				Ibuprofeno			
	% recuperación	Promedio	Desviación estándar	% encontrado	% recuperación	Promedio	Desviación estándar	% encontrado
75%	99,3	99,3	0,1	74,46	100,0	99,3	0,9	74,5
	99,2				98,7			
	99,9				99,7			
100%	99,9	100,0	1,6	100,0	99,7	99,8	1,7	99,8
	101,6				101,5			
	98,5				98,2			
125%	101,2	100,5	1,4	125,6	99,3	99,3	0,8	124,1
	98,9				98,5			
	101,3				100,1			

Tabla 5 Interpretación de los resultados de la robustez del método según el modelo de Plackett y Burman

s √2	Tiocolchicósido		Ibuprofeno	
	Influencia	Resultado	Influencia	Resultado
	9,9		10,1	
A	-3,3	CONFORME	3,0	CONFORME
B	1,0	CONFORME	-1,3	CONFORME
C	1,0	CONFORME	1,7	CONFORME
AB	1,4	CONFORME	3,2	CONFORME
AC	-1,1	CONFORME	-2,3	CONFORME
BC	-6,1	CONFORME	0,1	CONFORME
ABC	0,6	CONFORME	-5,2	CONFORME

A= pH | B= % Metanol | C= Flujo de fase móvil
S= Desviación estándar

Tabla 6 Determinación simultánea Tiocolchicósido e Ibuprofeno en medicamentos de diferentes marcas comerciales.

Medicamento	Réplica	TIOCOLCHICÓSIDO				IBUPROFENO			
		C _{TIO} (mg/comp)	Promedio (mg/comp)	% respecto a lo declarado	CV (%)	C _{IBU} (mg/comp)	Promedio (mg/comp)	% respecto a lo declarado	CV (%)
A	1	4,07	4,03	100,8	1,1	603,3	601,2	100,2	1,0
	2	4,04				604,8			
	3	3,98				594,6			
B	1	3,70	3,63	90,7	1,9	563,4	559,8	93,3	0,8
	2	3,59				561,0			
	3	3,58				554,4			
C	1	4,02	3,97	99,2	1,9	565,2	558,6	93,1	1,7
	2	4,01				563,4			
	3	3,88				547,8			
D	1	4,09	4,18	104,5	1,8	618,6	622,8	103,8	0,9
	2	4,24				629,4			
	3	4,20				620,4			

coeficiente de variación de 1,12 %. Ambos principios activos tenían coeficientes de variación menores al 2 %, lo que indica que la precisión evaluada a través de la repetibilidad del método se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

Precisión intermedia. Los resultados se encuentran reportados en la tabla 3, a pesar que se evidencian valores de concentración por comprimido diferentes en cada día, para ambos principios activos, se obtuvo una concentración porcentual con respecto a lo declarado (600 mg Ibuprofeno y 4 mg Tiocolchicósido) de 101,1 %; 98,4 % y 100,5 % para los días I, II y III, respectivamente en Ibuprofeno, y para Tiocolchicósido se obtuvo 102,0 %; 98,8 % y 101,3 % para los días I, II y III, respectivamente. Estos porcentajes se encuentran dentro del criterio de aceptación de 90 – 110 %, lo que indica que el método es aceptable en este aspecto ⁴. También se puede observar que los coeficientes de variación son menores al 2 %, para ambos analitos y diferentes días, lo que indica que la precisión evaluada a través de la precisión intermedia se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

Exactitud

Los porcentajes de recuperación para Ibuprofeno y Tiocolchicósido se muestran en la tabla 4.

Los resultados expresados en porcentaje de recuperación, tanto para Ibuprofeno como para Tiocolchicósido se encuentran dentro de los límites del criterio de aceptabilidad, comprendido entre 98,0 % a 102,0 % promedio para cada nivel, según lo establecido en la ICH ⁵ y un coeficiente de variación menor al 2,0%.

Robustez

En la tabla 5 se muestra la interpretación de los resultados correspondientes a la robustez, según el modelo de Plackett-Burman. La influencia de las variables estudiadas presentan valores por debajo de $s\sqrt{2}$, lo que permite concluir que el método es robusto bajo las tres condiciones de análisis estudiadas (pH de la fase móvil, composición de metanol y flujo), estos resultados permiten garantizar que el método analítico es capaz de soportar diferentes alteraciones experimentales sin afectar la determinación del contenido, tanto para Ibuprofeno como para Tiocolchicósido.

Determinación del contenido de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en medicamentos de diferentes marcas comerciales

En la tabla 6 se presentan los resultados del análisis de cuatro medicamentos de diferentes marcas comerciales (A, B, C y D).

Se determinó que todos los medicamentos cumplen con el criterio de aceptación de un porcentaje respecto a lo declarado entre 90 - 110 % y también cumple con un coeficiente de variación menor al 2%. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que el medicamento B en su promedio se encuentra entre los límites de aceptación, pero está por debajo con respecto a los otros medicamentos. Es importante destacar que a pesar de que este medicamento se encuentra vencido y los resultados analíticos indican que los valores están

dentro de los límites de aceptación, no se recomienda su uso, ya que la fecha de vencimiento nos indica el periodo durante el cual se garantizan en su totalidad la actividad y propiedades del fármaco por parte del fabricante, siempre y cuando haya sido almacenado correctamente. En las pruebas de control de calidad no basta con garantizar las cantidades de principio activo presente en la formulación farmacéutica, es necesario garantizar la liberación del fármaco con ensayos de disolución, aunque estas pruebas no fueron objetivo de nuestro trabajo es importante mencionar su importancia a la hora de aprobar un medicamento. También, los fármacos están compuestos por moléculas químicas que, con el paso del tiempo, pueden degradarse y resultar tóxicas para nuestra salud, por lo tanto, cuando se especifica la fecha de caducidad se está indicando hasta cuándo son estables los medicamentos. Es por ello que es importante realizar estudios de indicadores de estabilidad a fin de evaluar la presencia de impurezas y productos de degradación.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y se validó un método analítico para el análisis simultáneo de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en comprimidos, logrando una buena separación de los analitos de interés con Rs 3,64 y tiempo de análisis de 10 minutos. El método analítico desarrollado presenta un comportamiento lineal en el intervalo de concentración de 3,0 a 9,0 mg/mL para Ibuprofeno y 0,02 a 0,06 mg/mL para Tiocolchicósido, con un coeficiente de determinación mayor a 0,999, también demostró ser un método preciso, exacto y específico.

Los resultados del estudio demuestran que el método de separación y cuantificación permite analizar muestras de diferentes marcas comerciales de manera específica, y precisa, por lo que es un método selectivo, ya que permite identificar la presencia de Ibuprofeno y Tiocolchicósido de manera confiable. Por lo que se demuestra que el método analítico puede ser empleado para el análisis de rutina y control de tabletas que contengan como principios activos Ibuprofeno y Tiocolchicósido.

Respecto al análisis de un medicamento vencido se demuestra como el método propuesto es capaz de determinar las cantidades de principios activos presentes, observando una disminución de concentración de los principios activos en el medicamento vencido y a pesar que la concentración de los principios activos se encontraban dentro de los criterios de aceptación, no se recomienda consumirlo. Se recomienda realizar los ensayos de disolución correspondiente, a fin de conocer el comportamiento del medicamento en la liberación de los fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos el apoyo brindado por los miembros del Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, y al Centro de Química Analítica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela

REFERENCIAS

1. Gómez S., Martínez J., Martínez F. *Validación de un método analítico empleando cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación de ibuprofeno en medios biorrelevantes*. Universidad Nacional de Colombia. 2010.
2. Umarmar A., Bavaskar S., Yewale P. Thiocolchicoside as muscle relaxant: a review. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2011** 364-365.
3. Godoy R. *Monografía Tiocolchicosido*. Dirección médica de Laboratorios Galeno. Caracas DC 2012
4. *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, USP 38-NF 33; <1225> Validación de procedimientos farmacopeicos., Rockville, MD 2015 Vol. 1, pp 1581-1587.
5. International Conference on Harmonisation (ICH). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*, Ginebra, 2005.
6. Bor, M.; A. Guilarte; L. Guzmán; K. Macías; W. Mendoza. "Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicosido en tabletas." *Afinidad* [online], **2018**, 75, 581. <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/335960> [acceso 28-06-18]
7. *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, USP 38-NF 33<2> Medicamentos orales- pruebas de calidad de productos. Rockville, MD 2015 Vol. 1 pp.71-74.
8. Quattrocchi O., Abelaira S., Laba R. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Buenos Aires, Argentina, 1992.
9. Aguirre L, García F, García T, Illera M, Juncadilla M, Lizondo M. Validación de Métodos de Análisis en Materias Primas y Especialidades Farmacéuticas. En: Pérez J, Pujol M. *Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, AEFI*: Barcelona, España, 2001.