

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**



**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE IBUPROFENO Y TIOCOLCHICÓSIDO EN TABLETAS”**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por Br. María Isabel González Pérez, para optar al título de Licenciado en Química.

Tutores: Esp. Marisabel Bor

Dra. Rosa Amaro.

Caracas, octubre de 2016.

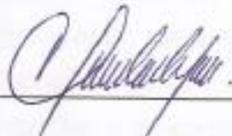
Yo profesora Marisabel Bor, investigadora del Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la profesora Rosa Amaro, investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente trabajo especial de grado, titulado:

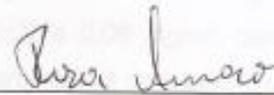
**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE IBUPROFENO Y TIOLCHICÓSIDO EN TABLETAS”.**

Que presenta la Br. María Isabel González, C.I. 20.418.773 para aspirar al título de Licenciado en Química, se está realizando en el Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante el año 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, octubre de 2016.



Esp. Marisabel Bor



Dra. Rosa Amaro

## RESUMEN

Ibuprofeno y Tiocolchicósido son dos principios activos utilizados para el alivio efectivo del dolor, su uso combinado produce una mayor eficiencia y recuperación funcional más rápida, ya que permite aliviar tanto el proceso inflamatorio resultante de la lesión tisular, como el espasmo muscular asociado. El método analítico para la determinación simultánea de ambos principios activos no aparece reportado en ninguna de las monografías oficiales, es por esto que, se propuso desarrollar y validar una metodología analítica por HPLC para la determinación simultánea de la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas.

Las condiciones cromatográficas optimizadas para la separación y análisis de ambos componentes fueron: Columna Hamilton PRP-1 (5 $\mu$ m, 4,1 x 150 mm), fase móvil constituida por Metanol: Acetonitrilo: Agua en proporciones (10:20:70) % v/v al 0,05 % de Trietilamina, esta fase móvil fue ajustada a pH 8,0  $\pm$  0,1 con ácido ortofosfórico al 85 %, el flujo de fase móvil fue de 1,3 mL/min, un volumen de inyección de 5  $\mu$ L y la longitud de onda de detección fue de 260 nm.

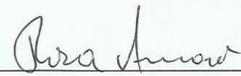
La validación del método se realizó de acuerdo a los requerimientos establecidos en el apartado <1225> de la USP 38 para la categoría I. El método analítico desarrollado y validado resultó ser selectivo, exacto, preciso, robusto y lineal en un rango de concentración de 3,0 a 9,0 mg/mL para el ibuprofeno y 0,02 a 0,06 mg/mL para el Tiocolchicósido. En el análisis de un medicamento vencido se demostró como el método propuesto es capaz de determinar las cantidades de principios activos presentes, observando una disminución de la concentración de los dos activos en el medicamento vencido.

**Palabras claves:** Ibuprofeno, Tiocolchicósido, determinación, validación, medicamento vencido.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: Desarrollo y Validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas. Presentado por la Br. María Isabel González Pérez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.



Esp. Marisabel Bor  
(Tutora)



Dra. Rosa Amaro  
(Tutora)



Dra. Katuska Chávez  
(Jurado)



Lic. Gustavo Pérez  
(Jurado)

## **AGRADECIMIENTOS**

Haber culminado satisfactoriamente esta etapa de mi vida se la debo principalmente a Olofin, Orula, Olodumare, mi padre Obatala, mi madre Oshun, mi travieso Elegua, todos mis santos y mis egguns por bendecirme y regalarme vida, salud y sabiduría.

A mi padre (Antonio González) que aunque no esté físicamente conmigo le agradezco que en vida me dio todo el apoyo incondicional en mis estudios, me enseñó a ser la persona que soy, me cuidó y protegió siempre que lo necesite. Estoy segura que te sientes orgulloso de mí y que nunca me abandonas.

A mi madre (Magaly Pérez) que este título es de ella, sin ti mimi no hubiese logrado este sueño, sueño que es de ambas, te amo como a nadie en este mundo, gracias por tu apoyo incondicional desde que elegí estudiar esta carrera.

A mi hermano (Derwing González) por ayudarme cada vez que podía, aunque lo que estudié no era tu mundo, siempre me ayudaste. A mi sobrina (Derly González) por ser ese angelito dulce que alegra mis días de tristeza.

A mi novio (Edgar Aponte) por ser una persona incondicional en toda la etapa de mi carrera, por ser mi amigo, compañero de estudio, mi cómplice y un gran novio. Te amo.

A mi familia (Abuela, papi, tíos (as), primos (as), madrinas, cuñado (a)) a cada uno de ustedes gracias por el apoyo brindado y entender mis momentos de ausencia en las reuniones familiares.

A los profesores que fueron parte de mi formación académica.

Y finalmente pero no menos importante a mis tutoras (Marisabel Bor y Rosa Amaro) por darme el privilegio de trabajar con ustedes en este proyecto de tesis, les agradezco todas las enseñanzas brindadas.

Gracias a todos.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>INDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>V</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</b> .....	<b>3</b>
II.1. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS. ....	3
II.2. IBUPROFENO. ....	4
Propiedades físicas y químicas del Ibuprofeno. ....	5
Características farmacocinéticas. ....	5
Contraindicaciones. ....	6
Efectos secundarios. ....	6
Método analítico para la determinación de ibuprofeno. ....	6
II.3. TIICOLCHICÓSIDO. ....	7
Propiedades físicas y químicas del Tiicolchicósido. ....	9
Características farmacocinéticas. ....	9
Contraindicaciones. ....	10
Efectos Secundarios. ....	10
Método analítico para la determinación de Tiicolchicósido. ....	10
II.4. COMBINACIÓN IBUPROFENO-TIICOLCHICÓSIDO. ....	11
II.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS. ....	12
Cromatografía de líquidos. ....	13
Cromatografía de reparto. ....	13
Cromatografía de par iónico. ....	15
II.6. VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO. ....	17
II.6.1. Parámetros de validación. ....	19

<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>30</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>46</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
V.1. OBJETIVO GENERAL	47
V.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
<b>VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>48</b>
VI. 1. EQUIPOS Y REACTIVOS.	48
Instrumentación.	48
Reactivos y solventes.	49
Materiales.	49
Patrones.	50
Muestras.	50
VI.2. BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	51
Preparación de patrones.	51
Selección de la longitud de onda.	52
Condiciones cromatográficas.	53
Selección de la fase móvil.	53
Preparación de material de referencia interno (MRI).	71
Tratamiento del material de referencia interno	71
VI.3. EVALUACIÓN DE LAS FIGURAS DE MÉRITO DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.	74
VI.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.	76
VI.4.1. Linealidad.	76
VI.4.2. Especificidad.	85
VI.4.3. Precisión.	98
VI.4.4. Exactitud.	105
VI.4.5. Robustez.	110

VI.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE IBUPROFENO Y TIICOLCHICÓSIDO EN MEDICAMENTOS DE DIFERENTES MARCAS COMERCIALES.-----	114
<b>VII. CONCLUSIONES.-----</b>	<b>121</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.-----</b>	<b>124</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.-----</b>	<b>125</b>
<b>APÉNDICE.-----</b>	<b>129</b>
APÉNDICE A. FIGURAS DE MÉRITOS.-----	129
APÉNDICE B. LINEALIDAD. CURVA DE CALIBRACIÓN.-----	130
APÉNDICE C. LINEALIDAD. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.-----	133
APÉNDICE D. ROBUSTEZ.-----	136
APÉNDICE E. ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DE LAS FIGURAS DE MÉRITO DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.-----	138
<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS.-----</b>	<b>139</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Propiedades físicas, químicas y farmacológicas del Ibuprofeno. _____	5
<b>Tabla II.</b> Propiedades físicas, químicas y farmacológicas del Tiocolchicósido. _____	9
<b>Tabla III.</b> Sistemas para cromatografía de pares iónicos en fase inversa. _____	16
<b>Tabla IV.</b> Datos requeridos para la validación. _____	18
<b>Tabla V.</b> Diseño para 3 variables en un estudio de robustez según Plackett y Burman. _____	28
<b>Tabla VI.</b> Calculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro. _____	29
<b>Tabla VII.</b> Resumen de los antecedentes consultados. _____	44
<b>Tabla VIII.</b> Descripción de las muestras utilizadas. _____	50
<b>Tabla IX.</b> Primeras pruebas para la selección de la fase móvil. _____	54
<b>Tabla X.</b> Segundas pruebas para la selección de la fase móvil. _____	59
<b>Tabla XI.</b> Terceras pruebas para la selección de la fase móvil. _____	63
<b>Tabla XII.</b> Cuartas pruebas para la selección de la fase móvil. _____	65
<b>Tabla XIII.</b> Pruebas para la optimización de la fase móvil. _____	67
<b>Tabla XIV.</b> Condiciones cromatográficas definidas. _____	70
<b>Tabla XV.</b> Figura de mérito para el Ibuprofeno y el Tiocolchicósido. _____	74
<b>Tabla XVI.</b> Criterios de aceptación para la linealidad del Ibuprofeno. _____	81
<b>Tabla XVII.</b> Criterios de aceptación para la linealidad del Tiocolchicósido. _____	82
<b>Tabla XVIII.</b> Especificidad del Ibuprofeno. _____	96
<b>Tabla XIX.</b> Especificidad del Tiocolchicósido. _____	97
<b>Tabla XX.</b> Precisión de sistema cromatográfica. _____	99
<b>Tabla XXI.</b> Precisión del método para el Ibuprofeno. _____	100
<b>Tabla XXII.</b> Precisión del método para el Tiocolchicósido. _____	101
<b>Tabla XXIII.</b> Límite de confianza al 95% para la repetibilidad. _____	102
<b>Tabla XXIV.</b> Precisión intermedia para el Ibuprofeno. _____	103
<b>Tabla XXV.</b> Precisión intermedia para el Tiocolchicósido. _____	103
<b>Tabla XXVI.</b> Límite de confianza al 95% para la precisión intermedia. _____	104

<b>Tabla XXVII.</b> Concentraciones fortificadas y sin fortificar para el Ibuprofeno. _____	107
<b>Tabla XXVIII.</b> Concentraciones fortificadas y sin fortificar para el Tiocolchicósido. ____	107
<b>Tabla XXIX.</b> Porcentaje de recuperación para el Ibuprofeno. _____	108
<b>Tabla XXX.</b> Porcentaje de recuperación para el Tiocolchicósido. _____	108
<b>Tabla XXXI.</b> Parámetros en la evaluación de la robustez. _____	111
<b>Tabla XXXII.</b> Matriz de Plackett y Burman utilizada. _____	112
<b>Tabla XXXIII.</b> Interpretación de los resultados de la robustez. Ibuprofeno. _____	113
<b>Tabla XXXIV.</b> Interpretación de los resultados de la robustez. Tiocolchicósido. ____	113
<b>Tabla XXXV.</b> Determinación del contenido de Ibuprofeno en medicamentos de diferentes marcas comerciales. _____	118
<b>Tabla XXXVI.</b> Determinación del contenido de Tiocolchicósido en medicamentos de diferentes marcas comerciales. _____	119

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.</b> Estructura del Ibuprofeno.-----	4
<b>Figura II.</b> Estructura del Tiocolchicósido.-----	7
<b>Figura III.</b> Estructura de la superficie de silicato totalmente hidrolizada.-----	14
<b>Figura IV.</b> Siloxanos-----	15
<b>Figura V.</b> Cromatograma de Tiocolchicósido a 371nm.-----	43
<b>Figura VI.</b> Espectros de adsorción molecular correspondiente a) Tiocolchicósido y b) Ibuprofeno.-----	52
<b>Figura VII.</b> Cromatogramas correspondientes a a) Tiocolchicósido y b) Ibuprofeno utilizando la prueba 1.-----	55
<b>Figura VIII.</b> Cromatogramas correspondientes a a) Tiocolchicósido y b) Ibuprofeno utilizando la prueba 2.-----	56
<b>Figura IX.</b> Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 3 y columna Symetry C <sub>18</sub> (5µm, 250 x 4,6 mm)-----	57
<b>Figura X.</b> Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 3 y columna Symmetry C <sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm)-----	58
<b>Figura XI.</b> Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 4.-----	60
<b>Figura XII.</b> Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 5.-----	61
<b>Figura XIII.</b> Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando para el cromatograma "a" la prueba 8 y para el cromatograma "b" la prueba 9, con una columna Symmetry C <sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm).-----	66
<b>Figura XIV.</b> Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 8, con una columna Hamilton PRP-1 (5µm, 4,1 x 150 mm).-----	68
<b>Figura XV.</b> Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 9, con una columna Hamilton PRP-1 (5µm, 4,1 x 150 mm).-----	69

<b>Figura XVI.</b> Cromatograma correspondiente a la acetona. -----	69
<b>Figura XVII.</b> Cromatograma correspondiente al material de referencia interno, tratado bajo las condiciones descritas. -----	73
<b>Figura XVIII.</b> Superposición de cromatogramas correspondiente a patrón combinado al 100% (5 inyecciones).-----	75
<b>Figura XIX.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de patrón control. -----	87
<b>Figura XX.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de muestra control. -----	88
<b>Figura XXI.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en reposo por 3 días. ---	89
<b>Figura XXII.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de muestra sometida a fotólisis por 3 días. -----	90
<b>Figura XXIII.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en presencia de ácido clorhídrico por 3 días. -----	91
<b>Figura XXIV.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en presencia de hidróxido de sodio por 3 días. -----	92
<b>Figura XXV.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en presencia de peróxido de hidrogeno por 3 días.-----	93
<b>Figura XXVI.</b> A.- Cromatograma y B.- Espectro de absorción molecular correspondiente a la muestra en presencia de peróxido de hidrogeno por 3 días. -----	94
<b>Figura XXVII.</b> Cromatograma y gráficos de pureza de muestra sometida a termólisis por 3 horas. -----	95
<b>Figura XXVIII.</b> Cromatograma correspondiente al medicamento A. -----	115
<b>Figura XXIX.</b> Cromatograma correspondiente al medicamento B. -----	116
<b>Figura XXX.</b> Cromatograma correspondiente al medicamento C.-----	116
<b>Figura XXXI.</b> Cromatograma correspondiente al medicamento D.-----	117

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Linealidad día 1. Ibuprofeno. _____	77
<b>Gráfico 2.</b> Linealidad día 2. Ibuprofeno. _____	78
<b>Gráfico 3.</b> Linealidad día 3. Ibuprofeno. _____	78
<b>Gráfico 4.</b> Linealidad día 1. Tiocolchicósido. _____	79
<b>Gráfico 5.</b> Linealidad día 2. Tiocolchicósido. _____	79
<b>Gráfico 6.</b> Linealidad día 3. Tiocolchicósido. _____	80
<b>Gráfico 7.</b> Análisis de residuales. Ibuprofeno. _____	83
<b>Gráfico 8.</b> Análisis de residuales. Tiocolchicósido. _____	84
<b>Gráfico 9.</b> Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Ibuprofeno. _____	109
<b>Gráfico 10.</b> Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Tiocolchicósido. _____	110

## **Glosario de abreviaturas.**

<b>USP</b>	The United States Pharmacopeial.
<b>ICH</b>	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
<b>AINE's</b>	Antiinflamatorios no Esteroideos.
<b>COX</b>	Enzima Ciclooxygenasa.
<b>IBU</b>	Ibuprofeno.
<b>TIO</b>	Tiocolchicósido.
<b>ACE</b>	Acetona
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
<b>LC</b>	Cromatografía de Líquidos.
<b>PDA</b>	Detector de Arreglos de Diodos.
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención.
<b>As</b>	Factor de asimetría.
<b>Rs</b>	Resolución.
<b>k</b>	Factor de retención.
<b>PA</b>	Angulo de pureza de la señal cromatografía. Gráfico de pureza.
<b>TH</b>	Ángulo umbral de la señal cromatografía. Gráfico de pureza.
<b>MRI</b>	Material de referencia interno.
<b>PVC</b>	Policloruro de Vinilo.

**PVC/PVDC** Policloruro de Vinilo/ Policloruro de vinilideno.

**TEA** Trietilamina.

## I. INTRODUCCIÓN

El hombre ha sufrido de ciertas enfermedades a través del tiempo, muchas de estas patologías pueden conducir a la muerte pero también pueden ser tratadas e incluso erradicadas con el uso de medicamentos naturales y sintéticos. Por esta razón, la aparición de medicamentos destinados al tratamiento del dolor, han sido parte fundamental en el alcance de una mejor calidad de vida.

El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable vinculada a daños reales o potencial a los tejidos. Los trastornos músculo-esquelético es un tipo de dolor que comprende cualquier daño o trastorno de las articulaciones y otros tejidos <sup>1</sup>.

Entre los medicamentos utilizados para este tipo de enfermedades se encuentran el Ibuprofeno y el Ticolchicósido. Siendo el Ibuprofeno un antiinflamatorio no esteroideo y uno de los tratamientos más utilizados en Venezuela como analgésico y antiinflamatorio en el tratamiento de la osteoartritis y la artritis reumatoidea, entre otras enfermedades <sup>2</sup>. Y el Ticolchicósido es un agente relajante muscular con acciones antiinflamatorias y analgésicas, es muy utilizado para el tratamiento de los espasmos musculares y los trastornos reumatológicos, ortopédicos y traumatológicos <sup>3</sup>.

Los antiinflamatorios no esteroideos y los agentes relajantes musculares conforman el tratamiento farmacológico del dolor no complicado 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 rápida. De hecho, varios estudios indican que la

combinación de antiinflamatorios no esteroideos y relajantes musculares ofrece beneficios superiores al uso de estos dos medicamentos por separado <sup>1</sup>.

En Venezuela la combinación de Ibuprofeno y Ticolchicósido en forma de tabletas es una de las más utilizadas. El método analítico de este tipo de medicamento no aparece reportado en ninguna de las monografías oficiales, por lo tanto, se propone desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la determinación simultánea de la cantidad de Ibuprofeno y Ticolchicósido en tabletas.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### II.1. Antiinflamatorios no esteroideos.

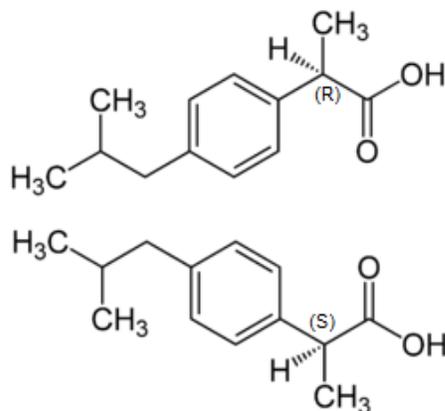
La primera opción en analgesia la constituyen los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's). Farmacológicamente son descritos como un grupo de fármacos químicamente heterogéneos con un mecanismo de acción compartido y reacciones adversas cualitativamente similares pero con perfiles de seguridad y actividad antipirética, analgésica y antiinflamatoria diferentes para cada integrante. Se trata de un grupo farmacológico muy versátil, con utilidad en diversas situaciones clínicas. Son analgésicos de alta efectividad en el tratamiento del dolor leve o moderado. El rápido desarrollo farmacológico de este grupo y su crecimiento constante ha hecho pasar, en pocos años, de un número reducido de fármacos a más de 100 moléculas en todo el mundo <sup>4</sup>.

Toda la actividad de los AINE's gira alrededor de la inhibición que ejercen sobre la enzima ciclooxigenasa (COX), que es la encargada de la síntesis de prostaglandinas, las cuales a su vez se encargan de diversas actividades fisiológicas, incluyendo la protección de mucosas gástrica <sup>5</sup>.

Las prostaglandinas son ácidos grasos compuestos por 20 carbonos que contiene un anillo de 5 carbonos. Estos compuestos se descubrieron en la década de los 60. Para hacer referencia a las prostaglandinas se utiliza las letras PG mas otra letra para su secuencia, el número o subíndice señala el número de dobles enlaces carbono-carbono que se encuentran fuera del anillo. Las prostaglandinas se sintetizan de los ácidos poliinsaturados de veinte carbonos de las membranas <sup>5</sup>.

## II.2. Ibuprofeno.

El Ibuprofeno (IBU) o ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico (Figura I) es un antiinflamatorio no esteroideo, y un reconocido inhibidor no selectivo de la COX. Es utilizado principalmente como analgésico y antiinflamatorio en el tratamiento de la osteoartritis y la artritis reumatoidea, entre otras enfermedades. También presenta propiedades antipiréticas. El IBU es considerado como uno de los compuestos más seguros dentro de su clase <sup>2</sup>.



**Figura I.** Estructura del Ibuprofeno.

El ibuprofeno es producto de un largo programa de investigación que durante la década de 1950 y 1960 buscaba desarrollar una "súper aspirina" para el tratamiento de la artritis reumatoidea con el objetivo de que ésta fuera tan o más efectiva que la existente pero fundamentalmente más segura. En 1964, dentro de un grupo de promisorios compuestos, es seleccionado para pasar a la fase de experimentación clínica. Dos años después se aprueba su incorporación al mercado británico. En 1972 se aprueban formulaciones pediátricas. En Estados Unidos es aprobado su empleo en 1974 <sup>4</sup>.

## Propiedades físicas y químicas del Ibuprofeno.

**Tabla I.** Propiedades físicas, químicas y farmacológicas del Ibuprofeno.

<b>Fórmula</b>	<b>C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>No. CAS</b>	<b>15687-27-1</b>
<b>Peso molecular</b>	<b>206,29 g/mol</b>
<b>Uso</b>	<b>Antiinflamatorio, analgésico</b>
<b>Intervalo de fusión</b>	<b>70-78°C</b>
<b>Solubilidad en agua</b>	<b>Insoluble</b>
<b>pKa</b>	<b>4,91</b>

## Características farmacocinéticas.

El Ibuprofeno se absorbe en el tracto gastrointestinal con rapidez después de la administración oral en el hombre, pudiendo observarse concentraciones plasmáticas máximas de 1 a 2 horas. La vida media plasmática es alrededor de 2 horas. El ibuprofeno se une en forma extensa (99%) a las proteínas plasmáticas, pero solo ocupa una fracción de todos los lugares de unión con fármacos en las concentraciones habituales. Pasa con lentitud a los espacios sinoviales y puede permanecer allí en concentraciones mayores cuando las concentraciones plasmáticas declinan. La

excreción de este fármaco es rápida y completa. Más del 90% de la dosis ingerida se excreta por orina en forma de metabolitos o sus conjugados <sup>6</sup>.

### **Contraindicaciones.**

No se recomienda el uso en mujeres embarazadas o en periodo de lactancia. No se recomienda su uso en menores de 12 años. No se administrará cuando exista sensibilidad conocida a la sustancia o al ácido acetilsalicílico <sup>7</sup>.

### **Efectos secundarios.**

Los efectos secundarios de este medicamento no son muy frecuentes, pero pueden presentar síntomas como cefalea, mareos, nerviosismo, malestar estomacal o calambres, vómito con sangre, estreñimiento, diarrea con sangre, silbido en los oídos, visión borrosa, inflamación de manos, pies, tobillos o piernas y sarpullido <sup>6</sup>.

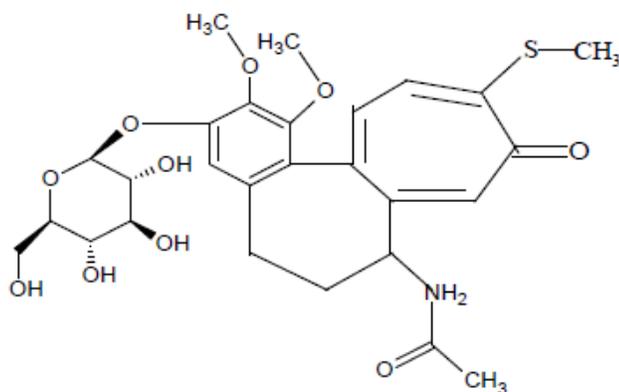
### **Método analítico para la determinación de ibuprofeno.**

En la literatura se encuentran una variedad de métodos, oficiales y no oficiales, para la determinación de IBP puro y de las distintas formas farmacéuticas que lo contienen. Algunos de ellos son: titulación directa con hidróxido de sodio en metanol, titulación potenciométrica, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), espectroscopía UV-Visible y el análisis infrarrojo con inyección en flujo <sup>8</sup>.

La técnica de HPLC es una de las adecuadas debido a su capacidad de separación, gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias, y su capacidad para realizar determinaciones cuantitativas exactas. Por lo tanto, es la técnica reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés “United States Pharmacopeia”) para el estudio de ibuprofeno bajo distintas formas farmacéuticas.

### II.3. Tiocolchicósido.

El Tiocolchicósido (TIO) o N-[3-( $\beta$ -Dglucopiranoxiloxi)-5, 6, 7,9-tetrahidro-1,2-dimetoxi-10(metil) 9-oxobenzo [a] heptalen-7il] acetamida (figura II) es un agente relajante muscular con acciones antiinflamatorias y analgésicas, también se utiliza por vía tópica para el tratamiento de los espasmos musculares y los trastornos reumatológicos, ortopédicas y traumatológicas <sup>3</sup>.



**Figura II.** Estructura del Tiocolchicósido.

El tiocolchicósido es un derivado semisintético sulfurado del colchicósido, un glicósido natural obtenido del *Colchicum autumnale*, y se diferencia de este último por la presencia de un grupo tiometil en sustitución de un grupo metoxi. Tal como han evidenciado las investigaciones realizadas en animales de experimentación y seres humanos, este fármaco, además de exhibir un potente efecto relajante sobre el músculo estriado, tiene una notable actividad antiinflamatoria y analgésica, por lo que constituye una opción adecuada para el tratamiento farmacológico de diversas condiciones traumáticas, ortopédicas y reumáticas, asociadas a dolor y espasmo de la musculatura esquelética. El Tiocolchicósido está indicado para el manejo de los trastornos dolorosos músculo-esqueléticos no complicados, de intensidad leve a moderada, en los que predomina el componente muscular (evidenciado por espasmo, espasticidad, puntos gatillo con un patrón de dolor referido, incremento de la tensión muscular o disminución del rango de movimiento). Por sus comprobadas propiedades analgésicas y antiinflamatorias, Tiocolchicósido es una alternativa satisfactoria al uso de AINE's en pacientes con dolor agudo que no toleran tales medicamentos o que presentan factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones (gastrointestinales o renales, por ejemplo) asociadas a la terapia con dichos agentes. Ahora bien, cuando en la génesis del dolor participan mecanismos inflamatorios, resulta conveniente asociar al Tiocolchicósido un agente antiinflamatorio no esteroideo; dicha estrategia brinda particulares beneficios analgésicos en caso de dolor moderado a severo acompañado de intensa contracción muscular <sup>1</sup>.

### Propiedades físicas y químicas del Tiocolchicósido.

**Tabla II.** Propiedades físicas, químicas y farmacológicas del Tiocolchicósido.

<b>Fórmula</b>	<b>C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>10</sub>S</b>
<b>No. CAS</b>	<b>602-41-5</b>
<b>Peso molecular</b>	<b>563,62 g/mol</b>
<b>Uso</b>	<b>Relajante muscular de acción central</b>
<b>Intervalo de ebullición</b>	<b>929,624°C a 760 mm de Hg</b>
<b>Solubilidad</b>	<b>Soluble en agua y en alcohol</b>
<b>Densidad</b>	<b>1,462 g/cm<sup>3</sup></b>
<b>Punto de inflamación</b>	<b>516,018 °C</b>
<b>Índice de refracción</b>	<b>1,657</b>
<b>pKa <sup>10</sup></b>	<b>12,74</b>

### Características farmacocinéticas.

Los estudios efectuados en individuos sanos demuestran que luego de la administración oral, Tiocolchicósido exhibe una rápida y satisfactoria absorción, la cual comienza a nivel gástrico y no se altera en presencia de alimentos, de modo que

alcanza concentraciones plasmáticas máximas luego de 0,5 a 1 hora ( $T_{m\acute{a}x}$ ) y tiene una amplia distribución tisular. El metabolismo es principalmente hepático y lleva a la producción de tres metabolitos, de los cuales sólo uno posee actividad biológica; la vida media de eliminación plasmática es de 2 a 6 horas, como resultado de mecanismos esencialmente extra-renales, pues 16% a 20% del fármaco es excretado en la orina y el resto (alrededor de 82%) se elimina con las heces <sup>1</sup>.

### **Contraindicaciones.**

Entre las contraindicaciones reportadas en la literatura se encuentran: hipersensibilidad al Tiocolchicósido, parálisis flácida e hipotonía muscular <sup>11</sup>.

### **Efectos Secundarios.**

Los efectos secundarios del Tiocolchicósido son sedación, somnolencia, visión borrosa o doble, estreñimiento, diarrea, mareo, nerviosismo y confusión, sequedad en la boca, dispepsia (dolor crónico o recurrente en la parte superior del abdomen, fatiga, dolor de cabeza, dolor de estómago, vomito, debilidad y posible dependencia tras el uso prolongado del mismo <sup>3</sup>.

### **Método analítico para la determinación de Tiocolchicósido.**

El análisis de Tiocolchicósido en tabletas recubiertas no aparece reportado en ninguna de las monografías oficiales. Sin embargo, se encontró en una investigación realizada

en la India en el 2013 por Pattanaik y colaboradores, donde utilizan HPLC como técnica de determinación de Tiocolchicósido en tabletas recubiertas.

#### **II.4. Combinación Ibuprofeno-Tiocolchicósido.**

Actualmente los AINE's y los agentes miorrelajantes conforman la piedra angular del tratamiento farmacológico del dolor no complicado 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 rápida. De hecho, varios estudios indican que la combinación de AINE's y relajantes musculares ofrece beneficios superiores al uso de estos dos medicamentos por separado <sup>1</sup>.

El tratamiento temprano de los trastornos dolorosos es fundamental ya que el control efectivo del dolor durante la fase inicial de los cambios fisiopatológicos inducidos por la lesión tisular, disminuye la discapacidad asociada, favorece la recuperación funcional y el reintegro rápido de los pacientes a sus actividades cotidianas, a la vez que está asociado a una mejor evolución y previene la progresión hacia un problema doloroso crónico. Ello implica no sólo brindar una analgesia efectiva, sino eliminar, además, el espasmo muscular que, a menudo, acompaña a las condiciones dolorosas agudas, subagudas y crónicas originadas en las estructuras de la unidad músculo-osteotendinosa pues la contracción muscular refleja y la subsiguiente sobrecarga de tensión pasiva en los tejidos del área afectada son los principales factores exacerbadores del dolor y favorecen la persistencia del mismo <sup>1</sup>.

Según las guías de la Sociedad Americana del Dolor (The American Pain Society) y el Colegio Americano de Médicos (American College of Physician) el acetaminofén, los AINE's tradicionales y los relajantes musculares son los agentes de primera línea para el tratamiento de la dorsolumbalgia y otros dolores agudos inespecíficos <sup>1</sup>.

## **II.5. Métodos Cromatográficos.**

Según la definición establecida por la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) la cromatografía es un método, usado principalmente para la separación de los constituyentes de una muestra, en la cual los componentes de la muestra se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, o un líquido retenido sobre un soporte sólido o gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película <sup>12</sup>.

La fase móvil transfiere al analito a través del sistema cromatográfico, hasta que éste finalmente emerge separado de otros solutos que eluyen antes o después. En general, el analito es transportado a través del medio de separación mediante una corriente de disolvente líquido o gaseoso denominado "eluyente". La fase estacionaria puede actuar mediante adsorción, como en el caso de adsorbentes como la alúmina activada y el gel de sílice, o puede actuar por disolución del analito, produciendo una partición del analito entre la fase estacionaria y la móvil. En el último proceso, se utiliza como fase estacionaria un recubrimiento líquido aplicado sobre un soporte inerte o unido químicamente al gel de sílice, o aplicado directamente en la pared de un capilar de sílice fundida <sup>13</sup>.

## **Cromatografía de líquidos.**

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. En la actualidad, toda la cromatografía de líquidos se efectúa con flujo presurizado y se utilizan las siglas LC o HPLC sin distinción<sup>14</sup>.

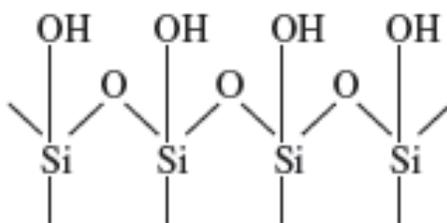
La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés “High Pressure Liquid Chromatography”), a veces llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. HPLC tiene ventajas distintivas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos que se van a analizar se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de los fármacos, aun siendo compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden cromatografiarse sin descomposición o sin necesidad de hacer derivados volátiles. La mayoría de los análisis farmacéuticos se basan en la cromatografía de partición y se completan dentro de los 30 minutos<sup>13</sup>.

## **Cromatografía de reparto.**

HPLC es una de las técnicas cromatográficas de reparto más utilizadas, al principio, en la cromatografía de reparto se utilizaban columnas del tipo líquido-líquido. En la

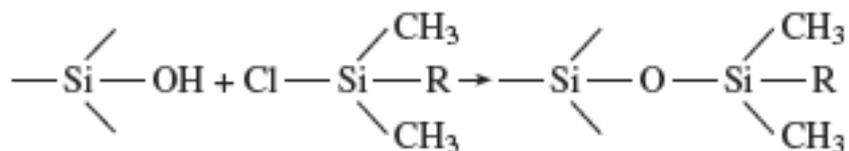
actualidad estas han sido reemplazadas por columnas de fase líquida unida químicamente a un soporte sólido. En la cromatografía líquido-líquido, la fase líquida se mantiene en su lugar mediante adsorción física, mientras que, en la cromatografía de fase unida, la misma está ligada por medio de un enlace iónico, lo que da por resultado rellenos muy estables e insolubles en la fase móvil. Asimismo, las columnas de fase unida son compatibles con las técnicas de elución con gradiente <sup>14</sup>.

En cromatografía de reparto, los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 1,5 a 10  $\mu\text{m}$ , pero las partículas de 3 a 5  $\mu\text{m}$  son las más comunes. La superficie de la sílice totalmente hidrolizada (hidrolizada por calentamiento con HCl 0,1 M durante uno o dos días) está constituida por grupos silanol químicamente reactivos (ver figura III) <sup>14</sup>.



**Figura III.** Estructura de la superficie de silicato totalmente hidrolizada.

Los siloxanos se forman gracias a la reacción de la superficie de silicato hidrolizada con un organoclorosilano, en la figura IV se muestra la estructura de los siloxanos, en donde R es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido <sup>14</sup>.



**Figura IV.** Siloxanos

Con base en las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto. En un principio, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad, como el agua o el trietilenglicol; y como fase móvil se empleaba un solvente relativamente no polar, como el hexano o el isopropileter. Ahora a este tipo de cromatografía se le conoce como cromatografía en fase normal. En la cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia un hidrocarburo, y la fase móvil es un solvente relativamente polar, como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano <sup>14</sup>.

### **Cromatografía de par iónico.**

Es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En la cromatografía de pares iónicos la fase móvil está constituida por una disolución tampón acuosa que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta a la del analito. Un contraión es un ion que se combina con el ion del analito para formar una pareja de iones, que es una especie neutra que es retenida por el relleno de la fase inversa. Obsérvese que la mayoría de los contraiones enumerados en la Tabla III poseen grupos alquilo que mejoran las características de retención, del par iónico resultante, sobre la fase estacionaria no polar. La elución de los pares iónicos se

consigue mediante una disolución acuosa de metanol o de otro disolvente orgánico soluble en agua <sup>15</sup>.

**Tabla III.** Sistemas para cromatografía de pares iónicos en fase inversa.

Muestra	Fase móvil	Contraión	Tipo de fase estacionaria
Aminas	0,1 M HClO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O/acetonitrilo	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	FUQ
	H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	FUQ
Ácidos carboxílicos	pH 7,4	(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	FUQ
	pH 7,4	(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	L

- Fase unida químicamente (FUQ).

- 1-pentanol adsorbido (L).

En la cromatografía de pares iónicos se proponen dos mecanismos de separación, en el primero, el contraión forma un par iónico sin carga con un ion del soluto de carga opuesta en la fase móvil. Después, este par iónico se divide en la fase estacionaria no polar, lo que da una retención diferencial de los solutos con base en la afinidad del par de iones de las dos fases. Otra posibilidad es que el contraión sea retenido fuertemente por la fase estacionaria normalmente neutra y le imparta una carga. La separación de los iones de soluto orgánico de carga opuesta ocurre luego por la formación de complejos reversibles de pares iónicos con los solutos retenidos con más firmeza que forman los complejos más fuertes con la fase estacionaria. Algunas separaciones únicas de compuestos tanto iónicos como no iónicos en la misma muestra pueden lograrse mediante esta forma de cromatografía de reparto <sup>14</sup>.

## II.6. Validación de método analítico.

Según el compendio de validación de métodos <1225> USP 38, la validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de procedimientos son, exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo y robustez. Dado que las opiniones pueden diferir respecto a la terminología y al uso.

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas van desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Estas categorías se indican a continuación.

**Categoría I:** Los procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados.

**Categoría II:** Los procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

**Categoría III:** Los procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).

**Categoría IV:** Pruebas de identificación. Para esta categoría sólo se requiere la prueba de especificidad. Una de las pruebas de identificación puede ser el HPLC, usualmente

consiste en la comparación del tiempo de retención o el tiempo de retención relativo de una muestra comparada con un estándar bajo las mismas condiciones cromatográficas y el mismo día. El incremento en el uso de detectores de arreglos de diodos (PDA) acoplados a HPLC permiten adicionalmente la comparación de espectros UV de estándares y muestras.

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la Tabla IV se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías <sup>16</sup>.

**Tabla IV.** Datos requeridos para la validación.

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Prueba de límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

\*Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Datos tomados de <1225> USP 38.

## II.6.1. Parámetros de validación.

### Exactitud.

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero, debe establecerse en todo su intervalo.

- En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un Estándar de Referencia), o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas. Cuando no sea posible obtener muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un procedimiento independiente. En ausencia de otra información, puede resultar necesario calcular la cantidad de una impureza basándose en la comparación de su respuesta con la del fármaco, pero el cociente entre las respuestas de cantidades iguales de la impureza y del fármaco (factor de respuesta relativo) debe ser utilizado siempre que se lo conozca.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Los documentos de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH por sus siglas en inglés) recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando al menos nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) <sup>16</sup>.

### **Precisión.**

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea, habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítica en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipo diferente dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

- La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas.

Los documentos de la ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración, o un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba) <sup>16</sup>.

Es posible estudiar la precisión mediante la evaluación de la repetibilidad, reproducibilidad y la precisión intermedia <sup>17</sup>.

- **Repetibilidad:** Estudia la precisión de un grupo de determinaciones realizadas tanto al patrón como a la muestra a la concentración de trabajo. Estas mediciones son realizadas por un analista, en un mismo día empleando los mismos equipos <sup>17</sup>.

- **Precisión intermedia:** Mide la dispersión de una serie de medidas provenientes de una muestra. Se realiza variando al menos una de las siguientes variables analista, días y equipos dentro de un mismo laboratorio <sup>17</sup>.

- **Reproducibilidad:** Inspecciona el desempeño de procedimiento analítico cuando se realiza en diferentes laboratorios <sup>17</sup>.

### **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. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios.

- En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

En un procedimiento analítico para impurezas, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de impurezas en concentraciones adecuadas, y la demostración de que esas impurezas se determinan con exactitud y precisión adecuadas.

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado (por ejemplo, un procedimiento farmacopeico u otro procedimiento validado). En una valoración, deben compararse los resultados; en pruebas de impureza cromatográfica, deben compararse los perfiles de impurezas.

Los documentos de la ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (por ejemplo, utilizando redes de diodos o espectrometría de masa) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente <sup>16</sup>.

La especificidad comúnmente se examina con:

- **Estudios de degradación:** Se somete la muestra a condiciones de degradación artificial o forzada, con: calor, luz, humedad, hidrólisis ácido-base y oxidación; con la finalidad de determinar su estabilidad mediante la comparación de las respuestas obtenidas contra una muestra y un patrón control. En general, recomiendan que la degradación no sea mayor del 20 % de la concentración inicial <sup>12</sup>.

- **Evaluación de la pureza de la banda:** Permite demostrar que la señal obtenida corresponde a un sólo componente o existe alguna otra sustancia superpuesta con la banda del analito <sup>12</sup>.

### **Límite de detección.**

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Puede determinarse a través de una estimación estadística con la siguiente expresión:

$$LD = \frac{3,3 S y/x}{S} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $S y/x$  = desviación estándar de la respuesta.

$S$  = pendiente de la curva de calibración.

**Límite de cuantificación.**

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Puede determinarse a través de una estimación estadística y se expresa como:

$$LC = \frac{10 S y/x}{S} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $S y/x$  = desviación estándar de la respuesta.

$S$  = pendiente de la curva de calibración.

**Linealidad e intervalo.**

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. En esta sección, la "linealidad" se refiere a la relación entre la concentración y la medida de valoración. En algunos casos, para lograr la linealidad, es necesario transformar la concentración y/o la medida. (Notar que los factores de

corrección usados en el análisis de regresión pueden cambiar cuando se aplica la transformación.) Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo, la raíz cuadrada, o la recíproca, aunque otras transformaciones son aceptables. Si no se puede lograr la linealidad, se puede utilizar un modelo no lineal. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de concentración versus respuesta, ya sea lineal o no lineal.

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el procedimiento analítico.

- La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones <sup>16</sup> y el coeficiente de correlación debe ser  $> 0,999$ .

### **Robustez.**

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros enumerados en la documentación del procedimiento, y a la vez, da una idea de su aptitud durante su uso normal. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico <sup>16</sup>. En el caso de métodos analíticos realizados por cromatografía líquida, algunos de los factores de estudio más comunes son, influencia de las variaciones de pH en la fase móvil, influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil, temperatura, velocidad de flujo <sup>12</sup>.

En la selección de variables a considerar debe utilizarse todo el conocimiento ya adquirido durante el desarrollo analítico para minimizar el número de ensayos a realizar. Cuando los factores a evaluar en el estudio de la robustez son muchos, se recurre a un diseño global que permite agruparlos, reduciendo el número de ensayos a efectuar <sup>12</sup>.

Un diseño muy utilizado es el de Plackett y Burman, que permite estudiar el efecto de  $n$  variables en  $n+1$  ensayos. El primer paso consiste en construir la matriz de diseño. La matriz de diseño es la relación que define el valor que deben tomar los factores en cada uno de los experimentos a realizar <sup>12</sup>. En la tabla V se ejemplifica el estudio de 3 variables en 8 ensayos. Las variables seleccionadas se indican con letras: las mayúsculas (A, B, C) corresponden al nivel alto y las letras minúsculas (a, b, c) al nivel bajo de la variable en cuestión, donde A, a es el flujo de la fase móvil en mL/min, B, b es pH de la fase móvil y C, c es concentración del solvente orgánico en la fase móvil en mg/mL. Luego se selecciona uno o más parámetros a medir y se obtienen los resultados indicados con las letras s, t, u, v, w, x, y, z <sup>12</sup>.

**Tabla V.** Diseño para 3 variables en un estudio de robustez según Plackett y Burman.

<b>Experimento</b>	<b>A, a</b>	<b>B, b</b>	<b>C, c</b>	<b>Resultados</b>
<b>1</b>	a	b	c	S
<b>2</b>	A	b	c	T
<b>3</b>	a	B	c	U
<b>4</b>	A	B	c	V
<b>5</b>	a	b	C	W
<b>6</b>	A	b	C	X
<b>7</b>	a	B	C	Y
<b>8</b>	A	B	C	Z

Una vez efectuado el experimento, se procede a calcular la diferencias de medias para cada parámetro en forma individual (ver tabla VI) <sup>12</sup>.

**Tabla VI.** Calculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro.

<b>Parámetros</b>	<b>Diferencia</b>
<b>A-a</b>	$V_A = \frac{1}{4} (s+t+u+w) - \frac{1}{4} (w+x+y+z)$
<b>B-b</b>	$V_B = \frac{1}{4} (s+t+u+w) - \frac{1}{4} (w+x+y+z)$
<b>C-c</b>	$V_C = \frac{1}{4} (s+t+u+w) - \frac{1}{4} (w+x+y+z)$

Para decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de s (desviación estándar del estudio de precisión) y raíz de 2 <sup>12</sup>.

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

### III. ANTECEDENTES

#### Ibuprofeno.

#### Farmacopea de Estados Unidos (USP). 2007 <sup>18</sup>.

La USP 38 NF 33 describe el análisis para la determinación de la pureza de Ibuprofeno en tabletas. Indicando que a través de un análisis por HPLC, las tabletas de Ibuprofeno deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Ibuprofeno ( $C_{13}H_{18}O_2$ ).

Condiciones analíticas recomendadas en este documento oficial para el método de HPLC.

**Fase móvil:** Disolver 4,0 g de ácido cloroacético en 400 mL de agua y ajustar con hidróxido de amonio a un pH de 3,0. Agregar 600 mL de acetonitrilo, filtrar y desgasificar. Hacer ajustes si fuera necesario.

**Solución de estándar interno:** Preparar una solución de valerofenona en fase móvil con una concentración de aproximadamente 0,35 mg/mL.

**Preparación estándar:** Disolver una cantidad pesada con exactitud de ER Ibuprofeno USP en la Solución de estándar interno para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 12 mg/mL.

**Solución estándar de 4-Isobutil acetofenona:** Disolver cuantitativamente una cantidad pesada con exactitud de 4-isobutil acetofenona en acetonitrilo hasta obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,6 mg/mL. Agregar 2,0 mL de esta solución madre a 100,0 mL de Solución de estándar interno y mezclar hasta obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,012 mg de 4-isobutil acetofenona por mL.

**Preparación de valoración:** Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente a 1200 mg de Ibuprofeno, a un recipiente adecuado, agregar 100,0 mL de solución de estándar interno y agitar durante 10 minutos. [NOTA: En el caso de Tabletas recubiertas, colocar un número de Tabletas, contado con exactitud, equivalente a no menos de 1200 mg de ibuprofeno, en un recipiente; agregar un volumen, medido con exactitud, de solución de estándar interno suficiente para obtener una preparación de valoración que contenga aproximadamente 12 mg/mL de ibuprofeno y aproximadamente 15 perlas de vidrio, agitar hasta la desintegración total de las Tabletas]. Centrifugar una porción de la suspensión así obtenida y usar el sobrenadante transparente como preparación de valoración.

**Sistema cromatográfico:** Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm x 25 cm rellena con material L<sub>1</sub> (C<sub>18</sub>). La velocidad de flujo es aproximadamente 2 mL por minuto.

- Cromatografiar la preparación estándar y registrar el cromatograma según se indica en el procedimiento: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,75 para el ibuprofeno y 1,0 para la valerofenona; los factores de asimetría para los picos individuales no son mayores de 2,5; la resolución, R, entre ibuprofeno y valerofenona no es menor de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.
- Cromatografiar la Solución estándar de 4-isobutil acetofenona y registrar el cromatograma según se indica en el procedimiento: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,0 para la valerofenona y 1,2 para la 4-isobutil acetofenona; los factores de asimetría para los picos individuales son no más de 2,5; la resolución, R, entre valerofenona y 4-isobutil acetofenona no es menor de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

**Procedimiento:** Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales aproximadamente 5  $\mu$ L de la preparación estándar, de la preparación de valoración y de la solución estándar de 4-isobutil acetofenona, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcular la cantidad, en mg de ibuprofeno ( $C_{13}H_{18}O_2$ ) en cada Tableta tomada, por la fórmula:

$$\text{mg de Ibuprofeno/Tableta} = 100 C (A / W) (RU / RS)$$

En donde C es la concentración, en mg por mL de Ibuprofeno USP en la preparación estándar; A es el peso promedio, en mg de una tableta; W es el peso, en mg del polvo de las tabletas tomado para preparar la preparación de valoración; y RU y RS son los cocientes de respuesta correspondientes a los picos de ibuprofeno y valerofenona, obtenidos de la preparación de valoración y la preparación estándar, respectivamente.

En el caso de tomar tabletas intactas, calcular la cantidad, en mg de ibuprofeno ( $C_{13}H_{18}O_2$ ) en cada tableta, por la fórmula:

$$\text{mg de Ibuprofeno/Tableta} = (CV / N) (RU / RS)$$

En donde V es el volumen, en mL, de la solución de estándar interno usado para preparar la preparación de valoración; N es el número de tabletas tomadas; y los otros términos son los definidos anteriormente.

**Desarrollo de métodos de ensayo y validación de comprimidos de Ibuprofeno por HPLC. Sovan Pattanaik, Sangeeta Mukhi, Gurudutta Pattnaik y Jasmin Panda. Publicado en el año 2013 <sup>19</sup>.**

Este método se desarrolló en un cromatógrafo Alliance 2695, con una columna C18 (Hypersil BDS, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) en modo isocrático y usando como fase móvil una mezcla tampón y acetonitrilo en una relación de 40:60 % (v/v). El tampón consto de agua grado HPLC: trietilamina: ácido ortofosfórico (1000 mL: 1 mL: 0,5 mL). El método lo llevaron a cabo con una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y volumen de inyección de 10  $\mu$ L, con una longitud de onda de trabajo de 220 nm. El tiempo de ejecución total cromatográfico fue de 5 minutos y la temperatura de la columna fue mantenida a 25°C.

Los patrones los realizaron con 40 mg de ibuprofeno estándar en un matraz aforado de 100 mL, luego le añadieron 70 mL del diluyente 1 (tampón 20: acetonitrilo 80) utilizando ultrasonido, completando el volumen con diluyente 1 y mezclando bien. Luego tomaron 5 mL de la preparación y lo transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, enrasando con diluyente 2 (tampón 40: acetonitrilo 60) y mezclando bien. La muestra fue preparada pesando no menos de 20 comprimidos, los comprimidos se pulverizaron con un mortero

y luego fueron transferidos a un matraz aforado de 250 mL, añadiendo 175 mL de diluyente 1, seguido de ultrasonido durante 30 minutos, finalmente lo llevaron a volumen con diluyente 1 y mezclaron bien, centrifugan una porción de la solución anterior durante 5 minutos, después tomaron 5 mL de la solución sobrenadante y transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, enrasaron con diluyente 2 y mezclando bien, finalmente inyectaron la solución en el sistema de HPLC.

El método desarrollado se validó mediante el uso de diversos parámetros de validación como exactitud, precisión, linealidad, especificidad y encontraron que todos los parámetros de validación estaban dentro de los criterios de aceptación, demostrando que el método era exacto, reproducible, lineal, preciso y selectivo, lo que demostró la fiabilidad de la metodología.

**Desarrollo de una metodología por HPLC para la estimación simultánea de paracetamol e Ibuprofeno en tabletas. Prasanna Reddy Battu y MS Reddy. Publicado en el año 2009 <sup>20</sup>.**

La determinación la realizaron con una columna de acero inoxidable 150 mm de largo, 4,6 mm de diámetro interno C<sub>18</sub>, con la fase móvil que contenía acetonitrilo y un tampón de fosfato en la proporción de 60:40 (v/v pH 7,0) a temperatura ambiente, el flujo de la fase móvil lo mantuvieron a 0,8 mL/min y una longitud de onda de 260 nm.

Las soluciones madre del estándar (1 mg/mL) de paracetamol e Ibuprofeno las prepararon disolviendo 25 mg de cada fármaco que contenía solo uno de los productos en 25 mL de acetonitrilo, por separado. Las soluciones fueron adecuadamente diluidas

con la fase móvil y mezcladas obteniendo una solución estándar que contiene 25 µg/mL de paracetamol y 20 µg/mL de ibuprofeno y 30 µg/mL de aceclofenaco como patrón interno.

Pesaron veinte comprimidos (Combiflam, Aventis Ltd, Mumbai) cada uno declaraba las cantidades 325 mg de Ibuprofeno y 400 mg de paracetamol, estas tabletas las pulverizaron y pesaron una cantidad del polvo equivalente a 25 mg de paracetamol y las llevaron a un matraz volumétrico de 25 mL. Los fármacos los extrajeron en acetonitrilo, el volumen lo ajustaron a 25 mL y después filtraron a través de filtro de membrana de 0,45 µm. A partir de esta solución, realizaron diluciones utilizando la fase móvil obteniendo una concentración final de 25 µg/mL de paracetamol, 20 µg/mL de Ibuprofeno y 30 µg/mL de aceclofenaco como estándar interno, esta solución la utilizaron para la estimación.

El tiempo de retención de Ibuprofeno, paracetamol y aceclofenaco fue de 2,48 - 4,45 y 6,34 minutos respectivamente. La linealidad del método la determinaron a los niveles de concentración que varían de 20 a 80 µg/mL para paracetamol y de 10 a 70 µg/mL para el Ibuprofeno, la curva de calibración la constituyeron por el trazado del factor de respuesta frente a la concentración de fármacos, los resultados mostraron que existe una excelente correlación entre el factor de respuesta y la concentración de los fármacos dentro del intervalo de concentraciones indicado anteriormente. El método de HPLC propuesto para la estimación simultánea de paracetamol e Ibuprofeno en combinación es exacto, preciso, lineal, resistente, robusto, simple y rápido.

**Desarrollo de una metodología por HPLC para la determinación simultánea de Ibuprofeno y famotidina en forma farmacéutica. L. Peikova, M. Georgieva y B. Tsvetkova. Publicado en el año 2014 <sup>21</sup>.**

Realizaron la separación con una columna C<sub>8</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), a temperatura ambiente en modo isocrático, con una fase móvil que contiene acetonitrilo y 0,5 M de tampón de fosfato de dihidrógeno de potasio a pH 2,2 ajustado con ácido orto-fosfórico (25:75). Detección UV realizado a 280 nm. El flujo de fase móvil fue de 1,2 mL/min.

La monografía reporta la preparación de tres patrones; el primer patrón (A), pesaron 16 mg de Ibuprofeno luego transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL y el volumen lo completaron con metanol quedando 320 µg/mL. El segundo patrón (B), con 27 mg de famotidina luego transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL y el volumen lo completaron con metanol quedando 270 µg/mL. El tercer patrón (C), a partir del patrón B, tomaron 5,0 mL en un matraz aforado de 50 mL y el volumen lo completaron con metanol quedando 27 µg/mL. La solución de referencia la prepararon diluyendo 5,0 mL de solución de reserva A y 2,0 mL de solución de reserva C con metanol en un matraz aforado de 20,0 mL (quedando 80 µg/mL de ibuprofeno y 2,7 µg/mL de famotidina). La muestra fue preparada con una cantidad exactamente pesada en polvo de la muestra de comprimido que contiene un equivalente de 400 mg Ibuprofeno y 13,3 mg de famotidina la transfirieron a matraz aforado de 100 mL y añadieron 70 mL de metanol, la mezcla la sometieron a ultrasonidos durante diez minutos y el volumen lo completaron con metanol, luego filtraron la muestra, 2,0 mL del filtrado lo diluyeron con metanol en un matraz volumétrico de 100,0 mL para dar una solución de ensayo que contenía 80 µg/mL de Ibuprofeno y 2,7 µg/mL de famotidina.

Encontraron que los tiempos de retención de Ibuprofeno y famotidina eran 3,19 minutos y 8,37 minutos, respectivamente. Los resultados de los estudios demostraron que el método de HPLC propuesto es simple, rápido, preciso y exacto, que puede ser aplicado para el análisis de rutina de ibuprofeno y famotidina en formas de dosificación tableta.

### **Tiocolchicósido.**

**Desarrollo y validación de un método por HPLC para la estimación de Tiocolchicósido en cápsulas. Desai Chandni H, Henal Chorawala, Zarna R. Dedania y S. M. Vijendraswamy. Publicado en el año 2015 <sup>22</sup>.**

Estos autores realizaron el análisis por cromatografía líquida con un equipo marca Thermo y un software Spinchrom, la columna que utilizaron es una Hypersil Silica 5 µm, (250 mm x 4,6 mm). La separación la lograron usando una fase móvil que consistía en n-heptano: metanol: cloroformo: ácido acético (70: 20: 10: 0,2% v/v). El flujo fue de 1 mL/min con una detección a 360 nm. La columna la mantuvieron a la temperatura ambiente y el volumen de inyección fue de 20 µL.

Prepararon la solución estándar con 10 mg de Tiocolchicósido en 50 mL de metanol en un matraz aforado de 100 mL, utilizaron ultrasonido hasta que estuvo completamente disuelto y luego enrasaron con metanol (concentración 100 µg/mL). Luego, tomaron 1 mL de la solución de reserva y diluyeron hasta 10 mL quedando en una concentración de 10 µg/mL. Con estos estándares prepararon patrones de soluciones de Tiocolchicósido que van de 5 a 15 µg /mL. La muestra la prepararon utilizando diez

cápsulas de Tiocolchicósido de 4 mg en polvo y las pesaron, la cápsula en polvo equivalió a 10 mg de Tiocolchicósido, luego lo transfirieron a un matraz de 100 mL, disuelto con metanol con ayuda de ultrasonido por 20 min y lo enrasaron con el mismo solvente. La solución la filtraron a través de filtro de nylon a 0,45  $\mu\text{m}$  y los primeros mililitros de filtrado lo descartaron. De esta solución tomaron 1 mL y la diluyeron hasta 10 mL (concentración 10  $\mu\text{g/mL}$ ).

El tiempo de retención de Tiocolchicósido bajo las condiciones analíticas descritas fue de 7,787 minutos. Por lo que concluyeron, que el método de HPLC para Tiocolchicósido es simple, rápido, exacto, preciso y económico y puede ser aplicado para el análisis cuantitativo de Tiocolchicósido en formas de cápsulas.

**Desarrollo y validación de un método por HPLC para la estimación simultánea de Tiocolchicósido (THC) Y Dexketoprofeno (DKP) en forma farmacéutica de tabletas. M. T. Harde, D. L. Dharam, S. B. Jadhav y A. R. Balap. Publicado en el año 2012<sup>23</sup>.**

El sistema HPLC que utilizaron fue un Waters 510, con un inyector Rheodyne (20  $\mu\text{L}$ ) y el detector de UV, la separación cromatográfica la realizaron bajo modo isocrático a temperatura ambiente con una columna  $\text{C}_{18}$  de (250 mm x 4 mm de diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$ ). La fase móvil consistió de metanol y tampón de fosfato (0.035 M) en la proporción 65:35 v/v (pH ajustado a 4,5 con ácido ortofosfórico). La fase móvil la mezclaron previamente y filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y desgasificada. El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$  y un flujo de 1 mL/min, la longitud de onda de detección fue de 260 nm.

Las soluciones madres estándar de Tiocolchicósido (THC) y Dexketoprofeno (DKP) la prepararon disolviendo 10 mg de cada fármaco por separado en fase móvil en un matraz de 100 mL y filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , el patrón de trabajo de estos fármacos los diluyeron a un más con fase móvil para obtener la concentración requerida de THC (4  $\mu\text{g/mL}$ ) y DKP (25  $\mu\text{g/mL}$ ). La muestra la prepararon con veinte comprimidos en polvo, la cantidad de polvo equivalente a 4mg de THC y 25 mg de DKP pesaron con precisión y luego transfirieron a un matraz aforado de 100 mL que contenía 70 mL de fase móvil, luego, lo sometieron a ultrasonido durante 15 minutos. La solución resultante la filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y enrasaron con fase móvil, el contenido final era de alrededor de 4  $\mu\text{g/mL}$  y 25  $\mu\text{g/mL}$  de THC y DKP respectivamente. Los patrones lo prepararon en intervalo de concentración desde 4-24  $\mu\text{g/mL}$  de THC y 5-30  $\mu\text{g/mL}$  para DKP.

El tiempo de retención para THC y DKP que encontraron eran 3,02 minutos y 8,91 minutos respectivamente. El método propuesto es exacto, preciso, simple, sensible, resistente y rápido, y puede ser aplicado con éxito para la estimación de THC y DKP en formulaciones farmacéuticas sin interferencia y con buena sensibilidad.

**Estimación simultánea de Etoricoxib y Tiocolchicósido por el método de HPLC en formas farmacéuticas combinadas. Sanjiv Kumar, Amit Joshi, Rahul Singh Thakur, Anupam K. Pathak y Kamal Shah. Publicado en el año 2011 <sup>24</sup>.**

La cromatografía la realizaron con un detector de longitud de onda variable y un inyector con un bucle de 20  $\mu\text{L}$ , la columna que usaron fue una  $\text{C}_{18}$  de (250 x 4,6 mm.,

5 $\mu$  partículas) y, la detección la llevaron a cabo a 220 nm. La fase móvil fue una mezcla de tampón (ácido trifluoroacético) y acetonitrilo al 75:25 v/v, la fase móvil la filtraron a través de un filtro de membrana de 0,45  $\mu$ m y la desgasificaron con ultrasonido antes de ser usada. Mantuvieron la velocidad de flujo de la fase móvil en 1,5 mL/min y la temperatura de la columna a temperatura ambiente. El total de tiempo de la corrida cromatográfica fue de 10 minutos.

La solución estándar la prepararon pesando 40 mg de Tiocolchicósido patrón de trabajo (solución madre A) y 60 mg de etoricoxib (solución madre B) la transfirieron a un matraz aforado de 100 mL, utilizaron ultrasonido para disolver el contenido y completaron el volumen con diluyente (acetonitrilo y agua 50:50 (v/v)). Luego, 1 mL de solución madre A y 10 mL de solución de B los diluyeron a 100 mL con diluyente, y con esta solución prepararon los patrones que contenían de 2 a 16 ppm de Tiocolchicósido y de 20 a 160 ppm de etoricoxib. Estas soluciones estándar las inyectaron para la construcción de curva de calibración por relación de pico del área de drogas (y) el trazado para cada uno de los fármacos frente a la concentración (x). Realizaron la solución de la muestra pesando exactamente 20 comprimidos, después trituraron las tabletas y este polvo equivalió a 300 mg de etoricoxib y 20 mg de Tiocolchicósido lo añadieron a un matraz volumétrico de 250 mL, lo agregaron a 100 mL de diluyente y utilizaron ultrasonido durante 30 minutos. Con agitación continua, enrasaron con diluyente y mezclaron, la solución la filtraron a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m; y 5 mL del filtrado lo tomaron y lo enrasaron a 100 mL con diluyente.

Los tiempos de retención de etoricoxib y Tiocolchicósido en estas condiciones fueron 6,6 y 3,1 minutos, respectivamente. Los resultados de este estudio mostraron que el desarrollado del método es simple y preciso para la determinación simultánea de etoricoxib y Tiocolchicósido en formulaciones farmacéuticas.

**Desarrollo de un método simple y sensible por HPLC para la estimación simultánea de etodolaco (ETO) y Tiocolchicósido (TIO) en tabletas combinadas. Abhijit D. Dhiware, Santosh V. Gandhi, Padmanabh B. Deshpande y Vandana S. Bhavnani. Publicado en el año 2012 <sup>25</sup>.**

Utilizaron el sistema HPLC Jasco PU-2080 plus, la separación la llevaron a cabo en una columna C<sub>18</sub> de (250 x 4,6 mm), usando acetonitrilo: tampón de fosfato de dihidrógeno de potasio 20 mM (65:35, v/v) como fase móvil a un caudal de 1 mL/min. Las soluciones estándar de muestras las inyectaron usando inyector con bucle de 50 µL y la detección la realizaron a 257 nm.

Las soluciones madres del estándar de ETO y TIO las prepararon separadamente disolviendo 10 mg de cada fármaco por separado en 10 mL de acetonitrilo para obtener concentración de 1000 µg/mL, de la que 1 mL de solución la diluyeron hasta 100 mL con acetonitrilo para obtener una solución estándar de 10 µg/mL. La muestra la prepararon con veinte comprimidos pesados con precisión, pesaron una cantidad de polvo equivalente a 50 mg de etodolaco y 1 mg de Tiocolchicósido y lo transfirieron a un matraz aforado de 10 mL que contenía aproximadamente 6 ml de fase móvil, luego utilizaron ultrasonido durante 10 minutos y finalmente enrasaron con fase móvil, la solución la filtraron a través de papel Whatman No. 41 y 1 mL de esta solución la transfirieron a un matraz aforado de 10 mL y el volumen lo completaron con fase móvil para obtener una solución de concentración de 50 µg/mL para ETO y 1 µg/mL para TIO. Después que establecieron las condiciones cromatográficas y estabilizaron el instrumento, inyectaron la solución de muestra de la tableta. Las inyecciones las

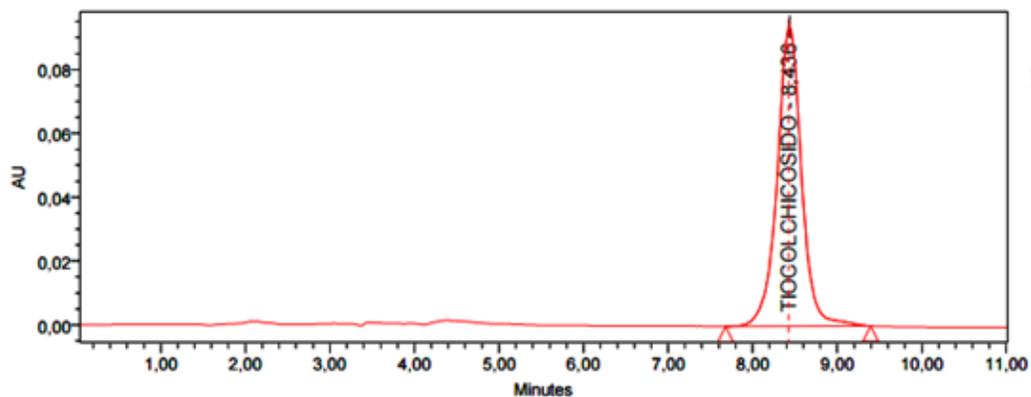
repitieron seis veces y la cantidad de cada fármaco presente por comprimido la estimaron a partir de las respectivas curvas de calibración.

Los tiempos de retención de TIO y ETO en estas condiciones fueron 2,240 minutos, 7,141 minutos respectivamente. El método de HPLC validado y empleado resultó ser simple, rápido, exacto, preciso y robusto y se puede utilizar para análisis de rutina de ETO y TIO en comprimido combinado.

**En estudio realizado en este laboratorio que todavía no ha sido publicado, desarrollaron y validaron una metodología analítica por HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas. M. Bor y colaboradores. En el año 2016.**

Realizaron el análisis por cromatografía líquida con una columna Sunfire® C18 RP de 4,6-mm x 25,0-cm que contenía un empaque de 5  $\mu\text{m}$ . La fase móvil estaba compuesta por una mezcla de Metanol: Acetonitrilo: Agua en proporciones 30:10:60 respectivamente y ajustada a un pH de  $8,00 \pm 0,05$ , el flujo de la fase móvil fue de 0,8 mL/min, el volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y la longitud de onda de 371nm.

La muestra la prepararon con tabletas de Tiocolchicósido, sacaron el peso promedio por tableta, luego transfirieron a un balón de 25 mL, equivalente a 1 mg de Tiocolchicósido, después añadieron 10 mL de fase móvil, agitaron y utilizaron ultrasonido y vortex por 5 minutos, luego llevaron a volumen con fase móvil y centrifugaron.



**Figura V.** Cromatograma de Tiocolchicósido a 371nm.

Encontraron que el tiempo de retención del Tiocolchicósido era de 8,436 minutos. El método validado demostró ser selectivo, preciso, lineal con un coeficiente de determinación de 0,999, exacto con un porcentaje de recuperación de 99,6 % y el 100%, permite detectar cantidades superiores a 0,0000105 mg/mL y cuantificar mayores a 0,000105 mg/mL.

**Tabla VII.** Resumen de los antecedentes consultados.

N°	Autores y año de publicación	Tipo de columna	Condiciones		Compuestos separados	Tiempo de retención (min)
			Composición, pH y flujo de la fase móvil	Longitud de onda (nm)		
1	USP (2015) <sup>18</sup>	C <sub>18</sub> de 4,6 mm x 25 cm	Ácido cloroacético: Agua: Acetonitrilo 4 g: 400 mL:600 mL pH= 3 2 mL/min	254	Ibuprofeno	—
2	S. Pattanaik (2013) <sup>19</sup>	C <sub>18</sub> de 150 x 4,6 mm, 5 µm	Buffer: Acetonitrilo 40:60 %. 1,5 mL/min	220	Ibuprofeno	3,297
3	P. Reddy (2009) <sup>20</sup>	C <sub>18</sub> de 150 mm x 4,6 mm	Acetonitrilo: Buffer fosfato 60:40% pH= 7 0,8 mL/min	260	Ibuprofeno Paracetamol	2,48 4,45
4	L. Peikova (2014) <sup>21</sup>	C <sub>8</sub> de 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrilo: Buffer fosfato 0,5 M (25:75) pH=2,2 1,2 mL/min	280	Ibuprofeno Famotidina	3,19 8,37
5	D. Chandni (2015) <sup>22</sup>	Hypersil Silica de 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	n-heptano: metanol: cloroformo: ácido acético (70: 20: 10: 0,2% v/v) 1 mL/min	360	Tiocolchicósido	7,787

<b>6</b>	M. T. Harde (2012) <sup>23</sup>	C <sub>18</sub> de 250 mm x 4 mm, 5 μm	Metanol: buffer fosfato 0.035 M (65:35 %) pH=4,5 1 mL/min	260	Tiocolchicósido  Dexketoprofeno	3,02  8,91
<b>7</b>	S. Kumar (2011) <sup>24</sup>	C <sub>18</sub> de 250 x 4,6 mm, 5μm	Buffer ácido trifluoroacético: acetonitrilo (75:25 %) pH=2,6 1,5 mL/min	220	Tiocolchicósido  Etoricoxib	3,1  6,6
<b>8</b>	A. Dhiware (2012) <sup>25</sup>	C <sub>18</sub> de 250 x 4,6 mm	Acetonitrilo: Buffer fosfato de dihidrógeno de potasio (65:35 %) 1 mL/min	257	Tiocolchicósido  Etodolaco	2,240  7,141
<b>9</b>	M. Bor (2016)	C18 RP de 4,6mm x 25,0cm, 5 μm	Metanol: Acetonitrilo: Agua (30:10:60) pH=8 0,8 mL/min	371	Tiocolchicósido	8,436

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad existe una mayor oferta por parte de los laboratorios farmacéuticos de productos para el alivio o tratamiento de diversas patologías, por lo cual hay un gran número de medicamentos disponibles en las farmacias. Se observa como ha incrementado el número de medicamentos que presentan más de un principio activo. Es importante para la industria farmacéutica el desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación simultánea de los fármacos o componentes de medicamentos de interés minimizando así el tiempo de análisis y costos.

Los organismos regulatorios de cada país están siendo más estrictos en el cumplimiento de los parámetros de calidad para el registro de productos farmacéuticos.

En las revisiones bibliográficas no se encontró ninguna metodología para el análisis simultáneo del Ibuprofeno y Tiocolchicósido por ningún método analítico. Este medicamento es ampliamente utilizado en el país y los pacientes lo adquieren sin receta médica. Por lo tanto, se justifica el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas, esta metodología debe garantizar que ese medicamento cumple con las exigencias de calidad necesarias para ser consumido en Venezuela.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1. Objetivo General**

Desarrollar y validar un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas.

### **V.2. Objetivos Específicos**

- Buscar las condiciones cromatográficas más idóneas para la separación de Ibuprofeno y Tiocolchicósido.
- Desarrollar un material de referencia interno (MRI).
- Optimizar las condiciones cromatográficas encontradas para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas.
- Determinar los parámetros de validación para el método planteado de Ibuprofeno y Tiocolchicósido combinados en tabletas.

## VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### VI. 1. Equipos y reactivos.

#### Instrumentación.

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia, de la casa comercial Waters, conformado por:
  - 1- Bomba, modelo 600E Millipore.
  - 2- Automuestreador modelo 717 plus Autosampler.
  - 3- Detector de UV-visible con arreglo de diodos, modelo 996 PDA.
  - 4- La adquisición y procesamiento de los datos del sistema cromatográfico se controla por el programa Millennium <sup>32</sup>.
- En la etapa preliminar de esta investigación se utilizó una columna Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm) Lote= 0236 y para la etapa de desarrollo y validación se utilizó una columna Hamilton PRP-1 (5µm, 4,1 x 150 mm) Lote= 2821.
- Balanzas microanalíticas, Mettler-Toledo, modelo AG245 de capacidad máxima (210,000 ± 0,0001) g y Adventurer OHAUS, modelo AR3130 de capacidad máxima (310,000 ± 0,001) g.
- Purificador de agua Nanopure, sistema de agua ultrapura.
- pH meter, Thermo Orion, modelo 420+ At.
- Bomba de vacío. Gast, modelo DQA-P104-AA.

- Plancha de calentamiento con agitación magnética. Barnstead Thermolyne, modelo sp131325.
- Ultrasonido. Branson, modelo 5200.
- Agitador mecánico Vortex, modelo Genie 2 Daigger.

### **Reactivos y solventes.**

- Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) grado HPLC. Lichrosolv.
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) grado HPLC. Mallinckrodt Chrom AR<sup>®</sup>.
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), 99 % de pureza. Merck KgaA.
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 35 %. Riedel-de Haën.
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ), 37 %. Merck KGaA.
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), 85 %. Fisher Scientific.
- Trietilamina ( $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ) grado HPLC. Scharlau.
- Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), 99,5%. Riedel-de Haen.
- Agua 18 M $\Omega$ , obtenida por una combinación de un sistema de pre-tratamiento y desionización. Cascada RO MK2 –Pall Corporation. Barnstead, NANOpure.

### **Materiales.**

- Membranas filtrantes EM Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Equipo de filtración de vidrio para fase móvil marca Millipore.
- Equipo de filtración metálico para filtrar muestras.

### Patrones.

- Ibuprofeno. Estándar de referencia secundario. Fabricante Sri krishna, Lote: 4000 Pureza= 100,6 %, fecha de vencimiento = 03-2020.
- Ticolchicósido. Estándar de referencia secundario. Lote: 30952 Pureza= 100,7 %, fecha de vencimiento = 04-2018.

### Muestras.

Se analizaron 4 medicamentos que contenían como sus principios activos Ibuprofeno y Ticolchicósido, 3 de estos productos se encontraban vigentes para la fecha de estudio, en actual comercialización y expendio en Venezuela, y uno de ellos se encontraba vencido. Estos medicamentos declaran que contienen 600 mg de ibuprofeno y 4 mg de tiocolchicósido. La descripción de estos medicamentos es la siguiente:

**Tabla VIII.** Descripción de las muestras utilizadas.

Medicamento	Color	Forma	Empaque	Lote	Fecha de vencimiento
A, comprimido recubierto	Azul	Oblonga	Blister PVC de color transparente	15585A	11/17
B, comprimido recubierto	Azul	Oblonga	Blister PVC de color transparente	131078A	11/15

C, Tableta recubierta	Naranja	Oblonga	Blister PVC de color transparente	3157190	02/18
D, Tableta	Blanca	Oblonga	Blister PVC PVDC de color ámbar	L634802	02/18

\*PVC = Policloruro de Vinilo.

\*PVC/PVDC = Policloruro de Vinilo/ Policloruro de vinileno.

## VI.2. Búsqueda de las condiciones cromatográficas.

En esta primera etapa, se buscaron las condiciones cromatográficas empleando equipos e insumos existentes en el laboratorio, para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido empleando la técnica de HPLC.

Una vez buscadas las condiciones cromatográficas se realizó la evaluación de los parámetros cromatográficos y validación del método y finalmente se analizaron medicamentos de diferentes marcas comerciales distribuidos en el país.

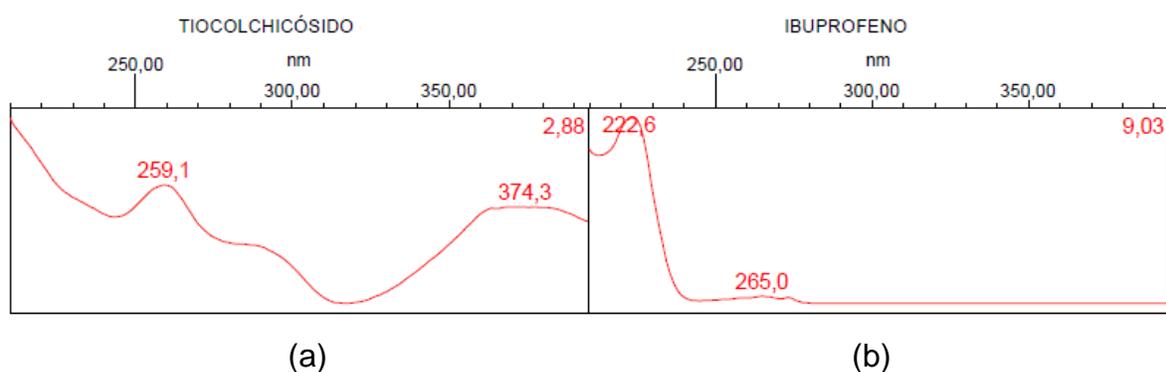
### Preparación de patrones.

- Ibuprofeno. Se preparó un patrón de Ibuprofeno de 6,0 mg/mL, empleando como disolvente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 50:50 % v/v.

- Tiocolchicósido. Se preparó un patrón de Tiocolchicósido de 0,04 mg/mL, empleando como disolvente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 50:50 % v/v.
- Preparación del patrón combinado de Ibuprofeno y Tiocolchicósido. Se preparó un patrón combinado de Ibuprofeno 6,0 mg/mL y Tiocolchicósido 0,04 mg/mL, empleando como disolvente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 50:50 % v/v.

### Selección de la longitud de onda.

Para determinar la longitud de onda de trabajo se empleó un detector de arreglo de diodos del equipo (PDA). Se utilizaron los patrones preparados anteriormente y se les realizaron un barrido de longitudes de ondas entre 200 y 400 nm respectivamente. En la figura VI a y b se observan los espectros de absorción molecular correspondiente al Ibuprofeno y al Tiocolchicósido.



**Figura VI.** Espectros de adsorción molecular correspondiente a) Tiocolchicósido y b) Ibuprofeno.

En la figura VI (a) se puede observar el espectro de absorción molecular correspondiente al Tiocolchicósido la presencia de dos bandas: a 259,1 nm y otra de menor intensidad a 374,3 nm. Para el espectro de absorción molecular correspondiente al Ibuprofeno figura VI (b) se observó la presencia de una banda a 222,6 nm.

Los máximos de absorción de ambas especies están entre 222 nm y 259 nm. Por lo tanto, se escogió una longitud de onda de trabajo cercana a las dos especies y de esta manera poder observar los dos principios activos a la misma longitud de onda, siendo la longitud de onda escogida 260 nm.

### **Condiciones cromatográficas.**

En la búsqueda de condiciones cromatográficas preliminares se utilizaron patrones puros de Ibuprofeno y Tiocolchicósido preparados previamente, para establecer el orden de elución y una vez obtenido el orden, se analizó el patrón combinado de ambas especies, para evaluar el comportamiento simultáneo. Se utilizó una elución isocrática a temperatura ambiente y una longitud de onda de 260 nm.

### **Selección de la fase móvil.**

De acuerdo con los antecedentes de la investigación y los insumos que se tenían en el laboratorio, se escogieron diferentes fases móviles hasta encontrar la más óptima. Para este procedimiento se utilizaron los patrones individuales de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en concentraciones de 6,0 mg/mL y 0,04 mg/mL respectivamente.

En la selección de las fases móviles adecuadas para realizar las evaluaciones preliminares, se consideró primeramente las propiedades ácido-base de las dos compuestos en estudio, dado que el Ibuprofeno contiene dos grupos funcionales carboxilos con un pKa de 4,91 y el Tiocolchicosido contiene un grupo funcional amino con un pKa de 12,74 lo que permite suponer que el ajuste de pH de la fase móvil puede ayudar a la separación de estas dos especies. De la revisión bibliográfica consultada se seleccionó 3 condiciones cromatográficas con pH diferente para evaluar el comportamiento de los compuestos a estos pH.

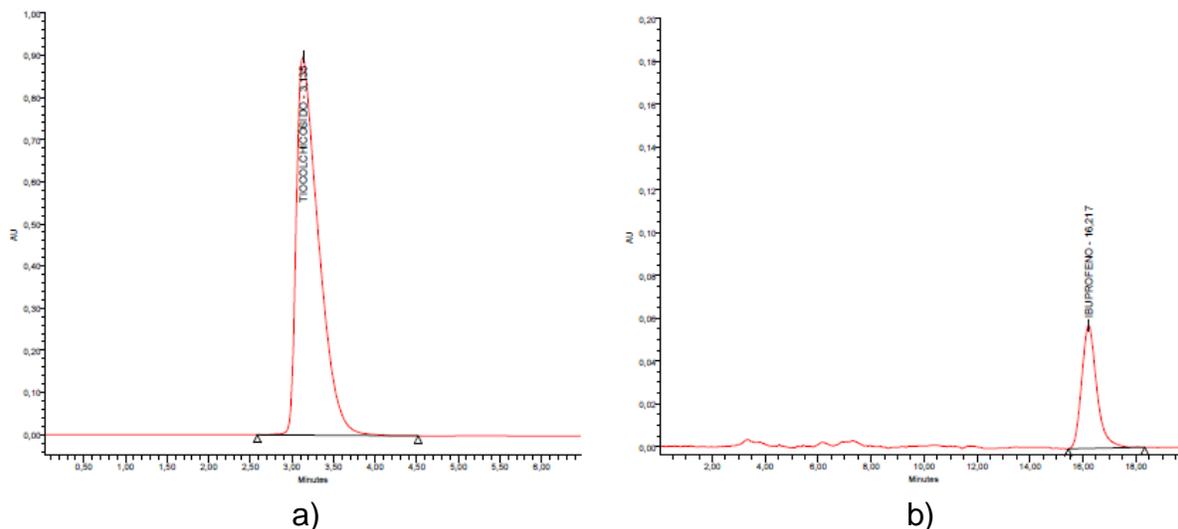
En la Tabla IX se observan las fases móviles seleccionadas, recordando que las condiciones de las pruebas 1 y 2 fueron tomadas de los antecedentes presentados anteriormente mientras que la prueba 3 fue tomada de estudios preliminares realizados en este laboratorio. Todas estas pruebas se realizaron con una columna Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 250 x 4,6 mm).

**Tabla IX.** Primeras pruebas para la selección de la fase móvil.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (µL)	Tiempo de retención (min)		
				TIO	IBU	ACE
1	Acetonitrilo: Buffer fosfato 0,035 M (60:40) % v/v pH 7,0	1,0	10,0	3,135	16,217	3,551
2	Metanol: Buffer fosfato 0,035 M (65:35) % v/v pH 4,44	0,7		5,475	>60	

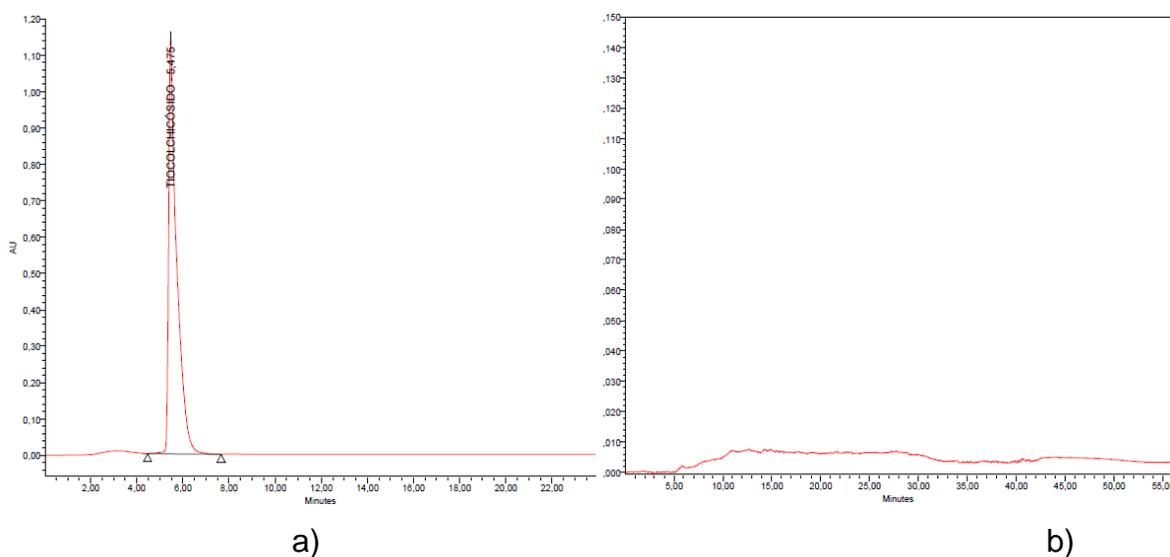
3	Metanol: Acetonitrilo: Agua (30:10:60) % v/v pH 8,0	1,0	5,0	10,364	40,515	5,307
---	---	-----	-----	--------	--------	-------

Para la prueba 1 (condiciones tomadas de P. Reddy y colaboradores <sup>20</sup>) se puede observar en la figura VII a y b la banda correspondiente al Ticolchicósido con tiempo de retención de 3,135 minutos y la banda correspondiente al Ibuprofeno a 16,217 minutos, obteniéndose como tiempo total de corrida 18 minutos. El tiempo de retención de la acetona fue de 3,551 (ver tabla IX). Esta fase móvil no es la apropiada para la separación de estas dos especies, ya que el compuesto que se desea utilizar para calcular el tiempo muerto (la acetona) eluye en un tiempo mayor que el del Ticolchicósido, se puede suponer que a este pH el Ticolchicósido se encuentra en un equilibrio acido-base parcialmente protonado y por tanto tendrá menos afinidad por una columna no polar en comparación con la acetona.



**Figura VII.** Cromatogramas correspondientes a a) Ticolchicósido y b) Ibuprofeno utilizando la prueba 1.

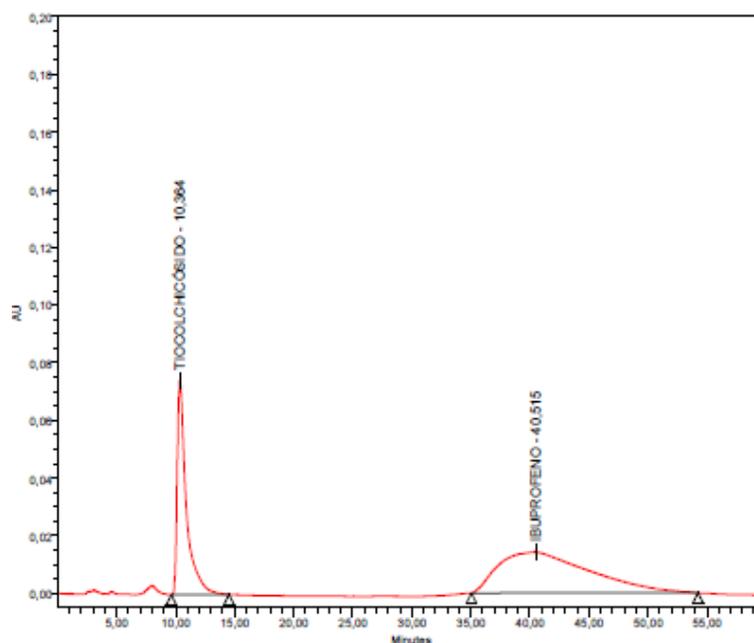
Un comportamiento similar se observó para la prueba 2 con las condiciones propuestas por Harde y colaboradores <sup>23</sup> para separar Ticolchicósido y dexketoprofeno en tabletas, a un pH de 4. En la figura VIII a y b se muestra la banda correspondiente al Ticolchicósido en 5,475 minutos, mientras que el ibuprofeno es fuertemente retenido por la fase estacionaria, bajo estas condiciones no fue posible obtener la señal correspondiente de este último compuesto en el detector hasta un tiempo de 60 minutos. En este caso el aumento del tiempo de retención de todas las especies es producto de la disminución del flujo de la fase móvil. Por dichas razones la prueba 2 es considerada inadecuada para la separación de los analitos de interés.



**Figura VIII.** Cromatogramas correspondientes a a) Ticolchicósido y b) Ibuprofeno utilizando la prueba 2.

En este punto se decidió disminuir el volumen de inyección a 5  $\mu$ L, ya que con un volumen de inyección de 10  $\mu$ L se encuentra saturado la señal del Ticolchicósido, evidenciándose por una absorción molecular de 1,20 AU.

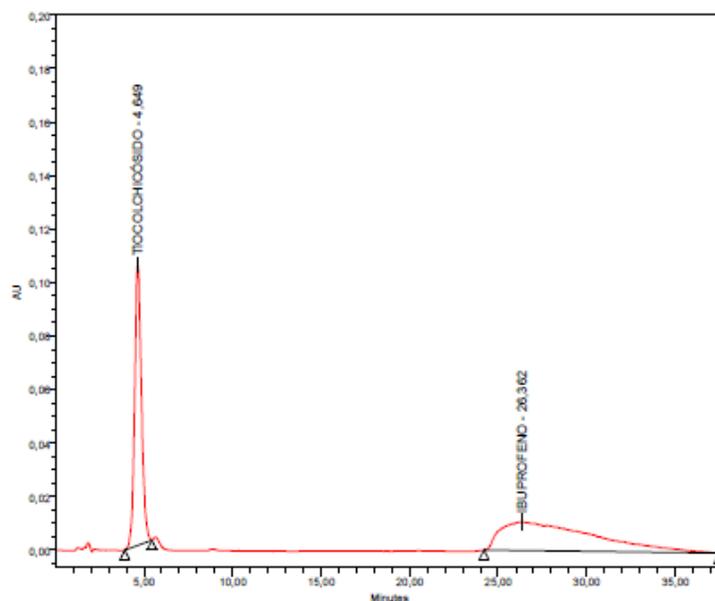
Las condiciones de la prueba 3 fue tomada de estudios previos realizados en este laboratorio para validar una metodología para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas, en donde fue observado un aumento del tiempo de retención del Tiocolchicósido con respecto a la acetona con el aumento del pH de la fase móvil a 8. Es así que se utilizó esta fase móvil para evaluar la capacidad de separación del Ibuprofeno y Tiocolchicósido. En la figura IX se puede observar la banda correspondiente al Tiocolchicósido en 10,364 minutos y la del Ibuprofeno en 40,515 minutos, para un tiempo total de corrida de 55 minutos. La acetona tiene un tiempo de retención de 5,307 bajo estas condiciones. Con esta prueba se logra por primera vez la separación de las dos compuestos en estudio con respecto a la acetona, sin embargo, el tiempo de análisis es sumamente largo por lo que de aquí en adelante se modificaron las condiciones cromatográficas para disminuir los tiempo de análisis sin perder la resolución de las 3 especies evaluadas, fijando el pH de la fase móvil en 8.



**Figura IX.** Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 3 y columna Symetry C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm)

Para tratar de disminuir el tiempo de análisis se repitió la prueba 3 con una columna más corta, utilizándose la Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm) Lote= 0236.

Con esta columna se puede observar en la figura X como los tiempos de retención son menores para ambos analitos. El tiempo de retención de Ticolchicósido fue de 4,649 minutos y para el Ibuprofeno de 26,362 minutos teniendo un tiempo total de corrida de 35 minutos. Este tiempo total de análisis sigue siendo alto y genera un alto ensanchamiento de pico del ibuprofeno que es el compuesto más retenido en la columna.



**Figura X.** Cromatograma correspondiente al Ticolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 3 y columna Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm)

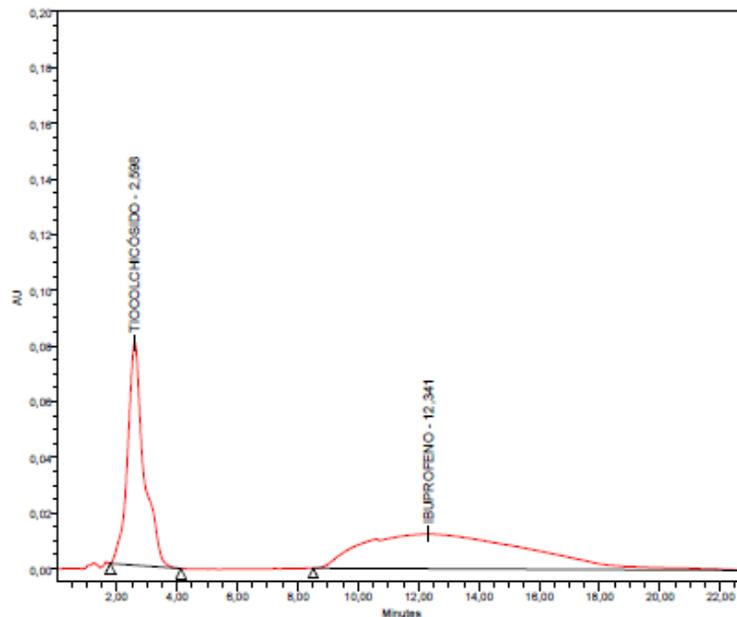
Por la alta retención del Ibuprofeno se decidió seguir haciendo ajustes en la fase móvil tratando de disminuir la afinidad del mismo hacia la fase estacionaria por lo que se realizó variación de las proporciones de los solventes orgánicos. Las condiciones y resultados de estas pruebas se resumen en la tabla X. Estas pruebas se realizaron con la columna Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm) y un volumen de inyección de 5 µL.

**Tabla X.** Segundas pruebas para la selección de la fase móvil.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Tiempo de retención (min)			Resolución (R <sub>s</sub> )	
			TIO	IBU	ACE	ACE-TIO	TIO-IBU
3*	Metanol: Acetonitrilo: Agua (30:10:60) % v/v pH 8,0	1,0	4,649	26,362	2,185	1,33	3,56
4	Metanol: Acetonitrilo: Agua (25:15:60) % v/v pH 8,0	1,0	2,598	12,341	2,021	0,81	1,55
5	Metanol: Acetonitrilo: Agua (20:20:60) % v/v pH 8,0	1,0	2,758	4,661	2,118	1,40	1,62

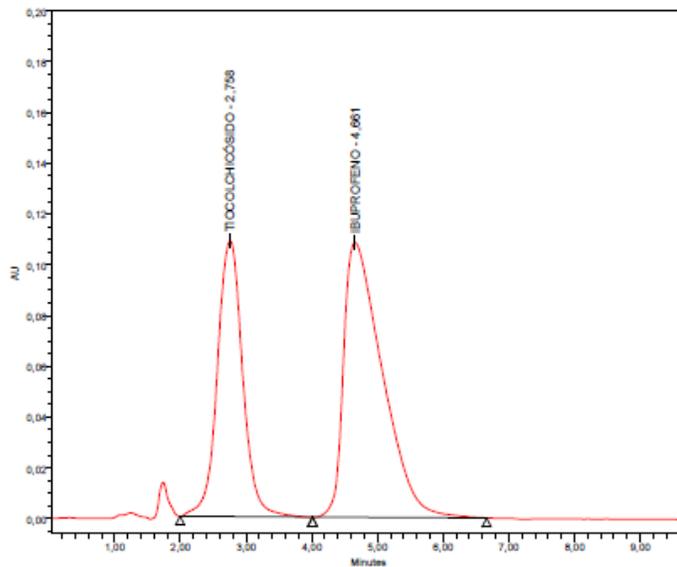
La prueba 4 y 5 son variaciones en la composición de los solventes orgánicos partiendo de la prueba 3\*. Se obtuvo que al disminuir la proporción de metanol y aumentar la de acetonitrilo el Ibuprofeno se vuelve menos afín a la fase estacionaria quedando menos tiempo retenido en la columna.

La figura XI muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatograficas de la prueba 4, se puede observar la banda correspondiente al Ticolchicósido en 2,598 minutos y el Ibuprofeno en 12,341 minutos teniendo un tiempo total de corrida de 22 minutos. Debido a la alta dispersión de la banda del ibuprofeno esta fase móvil no es adecuada para la separación de estas especies.



**Figura XI.** Cromatograma correspondiente al Ticolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 4.

En la figura XII correspondiente a la prueba 5, se puede observar la banda correspondiente al Tiocolchicósido en 2,758 minutos y la del Ibuprofeno en 4,661 minutos teniendo un tiempo de corrida de 7 minutos. Se logra una buena resolución entre el TIO y el IBU pero la resolución entre el ACE y TIO se encuentra ligeramente por debajo al mínimo de resolución aceptable ( $R_s > 1,5$ ). Como la USP recomienda valores de  $k$  entre 1 y 10 para una separación ideal se calculó el  $k$  para el ACE y TIO y este fue de 0,69, siendo este menor de 1, por lo que se decidió seguir evaluando las condiciones cromatográficos para encontrar una mejor separación entre el ACE y TIO



**Figura XII.** Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 5.

Con el pH fijado en 8, los parámetros cromatográficos que hemos variado solo han modificado el factor de retención de los analitos de interés y bajo estas condiciones no hemos logrado resultados satisfactorios. Una ventaja que tiene la cromatografía líquida con respecto a la cromatografía gaseosa es que se puede modificar también el factor de selectividad con la variación de las características de la fase móvil, sin necesidad de

cambiar la columna, en nuestro caso vamos a utilizar un formador de par iónico para modificar la selectividad.

Dado que solo a pH 8 se logra la separación entre el ACE y TIO para ciertas condiciones cromatográficas, se decidió utilizar un formador de par iónico afín al ibuprofeno para modificar así su selectividad en la columna, manteniendo de esta forma el pH de la fase móvil.

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 debe ser una amina <sup>15</sup>. Para este caso se utilizó como agente formador de par iónico la trietilamina. En las siguientes pruebas se decidió el porcentaje de agente formador de par iónico y se explican en la tabla XI. Para estos estudios se continuó utilizando la columna Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm).

**Tabla XI.** Terceras pruebas para la selección de la fase móvil.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Tiempo de retención (min)			Resolución ( $R_s$ )	
			TIO	IBU	ACE	ACE-TIO	TIO-IBU
6	Metanol: Acetonitrilo: Agua (20:20:60) % v/v pH 8,0  0,10 % TEA	1,0	2,989	18,056	2,025	1,06	2,31
7	Metanol: Acetonitrilo: Agua (20:20:60) % v/v pH 8,0  0,05 % TEA	1,0	2,339	7,292	1,956	0,86	2,88

En la prueba 6 y 7 se pudo observar como a medida que se aumentaba el porcentaje de agente formador de par iónico los tiempos de retención aumentaban, teniendo un tiempo total de corrida mayor. En ambas pruebas se observaba una buena separación entre los dos analitos, sin embargo la resolución de ACE-TIO no es aceptable, ya que es menor a 1,5 lo que implica que existe un alto solapamiento de estas bandas. Cuando se utilizó un porcentaje de agente formador de par iónico de 0,1 % (prueba 6), se observaba una mayor separación entre los picos cromatográficos y un mayor tiempo

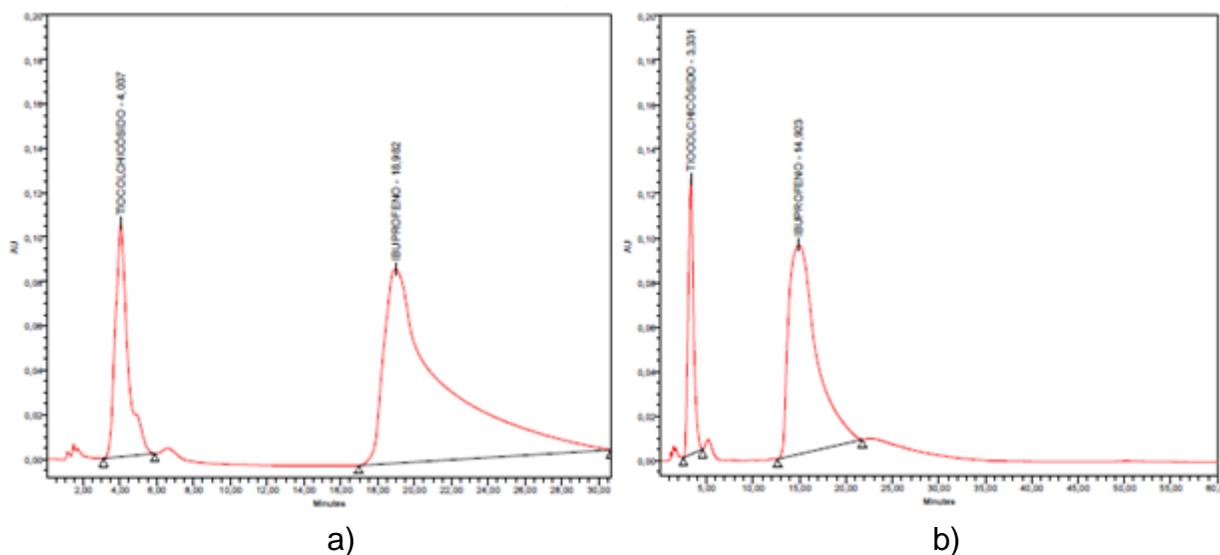
de corrida. Como el objetivo en cromatografía por HPLC es lograr una buena separación en un menor tiempo de corrida, se utilizó el porcentaje de 0,05 % de Trietilamina como agente formador de par iónico y se continuó ajustando condiciones cromatográficas.

En este punto, se decidió aumentar la composición de agua presente en la fase móvil, debido a que por ser el Tiocolchicósido un compuesto de baja polaridad este será menos afín a la fase móvil cuando esta aumente de polaridad, por ende quedara más tiempo retenido el Tiocolchicósido en la fase estacionaria. Se decidió el aumento de la composición del agua porque entre los 3 solventes empleados este es el más polar. Al subir la composición de agua al 70% se requirió modificar de nuevo la composición de solventes orgánicos por lo que en las pruebas 8 y 9 se evaluó el efecto de dos composiciones diferentes de metanol/acetonitrilo para ver el efecto total sobre los componentes de la muestra. Las pruebas se muestran en la tabla XII. Se continuó utilizando la columna Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm) para estos estudios.

**Tabla XII.** Cuartas pruebas para la selección de la fase móvil.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Tiempo de retención (min)			Resolución ( $R_s$ )	
			TIO	IBU	ACE	ACE-TIO	TIO-IBU
8	Metanol: Acetonitrilo: Agua (15:15:70) % v/v pH 8,0  0,05 % TEA	1,0	4,037	18,982	2,077	1,69	5,28
9	Metanol: Acetonitrilo: Agua (10:20:70) % v/v pH 8,0  0,05 % TEA	1,0	3,331	14,923	2,063	1,54	3,47

Como se esperaba en las pruebas 8 y 9 se observa una mejor retención del Ticolchicósido con la fase estacionaria, saliendo en un mayor tiempo de retención al igual que el Ibuprofeno, logrando una mejor resolución entre ACE-TIO y TIO-IBU para ambas pruebas, lo que representa los mejores resultados obtenidos hasta ahora. En la figura XIII a y b se observa el cromatograma correspondiente al Ibuprofeno y al Ticolchicósido para estas pruebas. Lamentablemente como se puede observar en las figuras a y b el ibuprofeno tiene una gran cola.



**Figura XIII.** Cromatograma correspondiente al Tiocolchicosido e Ibuprofeno utilizando para el cromatograma "a" la prueba 8 y para el cromatograma "b" la prueba 9, con una columna Symmetry C<sub>18</sub> (5µm, 4,6 x 150 mm).

Una de las grandes desventajas que tienen las columnas de fase unida químicamente con grupos siloxanos (ver figura IV) es que el recubrimiento de la superficie por sililación se limita a 4 µmol/m<sup>2</sup> 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 origina picos cromatográficos con cola en especial con los solutos básicos. Para reducir este efecto, los rellenos de siloxano muchas veces se desactivan por un proceso de bloqueo mediante reacción con clorotrimetilsilano, el cual, debido a su pequeño tamaño, puede unirse químicamente a muchos de los grupos silanol que no habían reaccionado, estas columnas son más costosas que las convencionales<sup>14</sup>. Se han desarrollado también las columnas en base poliméricas que se comportan de manera similar a las columnas de fase unida químicamente con grupos siloxanos pero sin su polaridad indeseable como por ejemplo

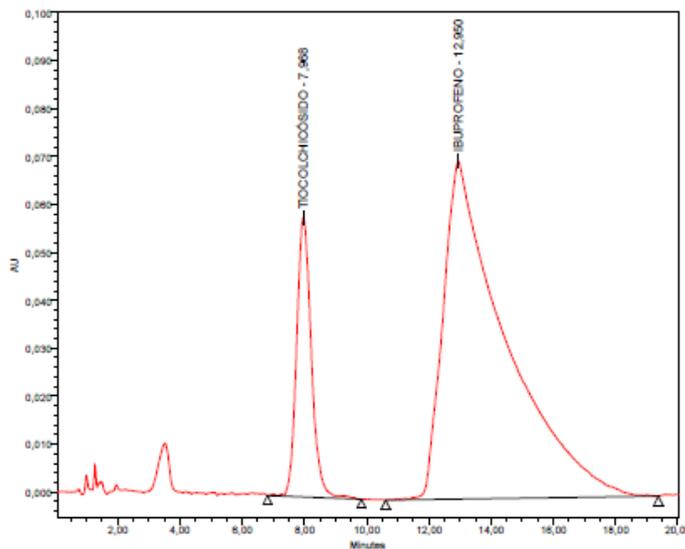
las PRP fabricadas de poliestireno-divinil benceno. Estas columnas tienen además la gran ventaja de poder trabajar a pH entre 1 y 13 lo que permiten aumentar su selectividad significativamente <sup>26</sup>.

Las pruebas 8\* y 9\*, se realizaron con una columna Hamilton PRP-1 (5µm, 4,1 x 150 mm) y se aumentó el flujo de la fase móvil a 1,3 mL/min, para minimizar la cola producida en el pico del ibuprofeno. Estas pruebas se resumen en la tabla XIII.

**Tabla XIII.** Pruebas para la optimización de la fase móvil.

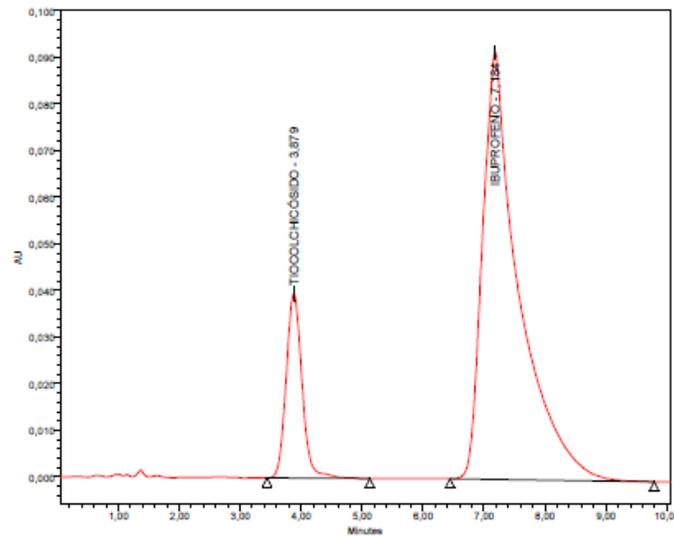
Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Tiempo de retención (min)			Resolución (R <sub>s</sub> )	
			TIO	IBU	ACE	ACE-TIO	TIO-IBU
8*	Metanol: Acetonitrilo: Agua (15:15:70) % v/v pH 8,0  0,05 % TEA	1,3	7,968	12,950	1,826	6,62	2,05
9*	Metanol: Acetonitrilo: Agua (10:20:70) % v/v pH 8,0  0,05 % TEA	1,3	3,879	7,184	1,798	4,30	3,64

En la figura XIV se puede apreciar la banda correspondiente al Tiocolchicósido en 7,968 minutos y la del Ibuprofeno en 12,950 minutos teniendo un tiempo de corrida de 20 minutos, lográndose una buena resolución de ACE-TIO y TIO-IBU para la prueba 8\* donde se utiliza la columna Hamilton PRP-1 (5 $\mu$ m, 4,1 x 150 mm), sin embargo todavía sigue existiendo un alto ensanchamiento del pico de Ibuprofeno y un alto tiempo de análisis.



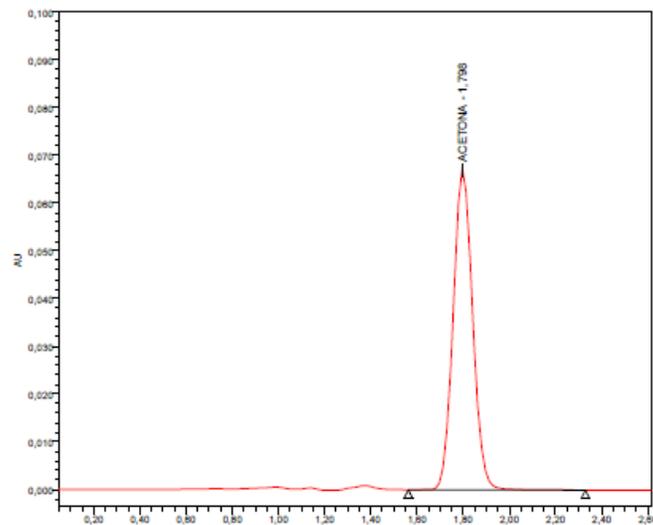
**Figura XIV.** Cromatograma correspondiente al Tiocolchicósido e Ibuprofeno utilizando la prueba 8, con una columna Hamilton PRP-1 (5 $\mu$ m, 4,1 x 150 mm).

En la prueba 9\* con la columna Hamilton PRP-1 (5 $\mu$ m, 4,1 x 150 mm) se puede observar en la figura XV la banda correspondiente al Tiocolchicósido en 3,879 minutos y la del Ibuprofeno en 7,184 minutos teniendo un tiempo de corrida de 10 minutos, lográndose una buena resolución de ACE-TIO y TIO-IBU. Como la USP recomienda valores de k entre 1 y 10 para una separación ideal, se calculó el k para el ACE y TIO y este fue 1,16 respecto al tiempo muerto, lo que es aceptable. Considerando esta fase móvil la más adecuadas para la separación, ya que logra una buena resolución en el menor tiempo posible.



**Figura XV.** Cromatograma correspondiente al Ticolchicosido e Ibuprofeno utilizando la prueba 9, con una columna Hamilton PRP-1 (5 $\mu$ m, 4,1 x 150 mm).

La determinación del tiempo muerto se realizó mediante la inyección de una solución de acetona de 6  $\mu$ L/mL de concentración. Se observó una pequeña banda a un tiempo de 1,798 minutos, señal a la cual se le adjudicó el valor correspondiente al tiempo muerto, el cromatograma correspondiente se presenta en la figura XVI.



**Figura XVI.** Cromatograma correspondiente a la acetona.

Las condiciones cromatográficas definidas para la metodología analítica se presentan en la tabla XIV.

**Tabla XIV.** Condiciones cromatográficas seleccionadas.

Fase móvil	Metanol: Acetonitrilo: Agua (10:20:70) % v/v 0,05 % TEA
pH de la fase móvil	8,0 ± 0,1
Flujo de la fase móvil	1,3 mL/min
Volumen de inyección	5,0 µL
Temperatura	Ambiente
Columna	Hamilton PRP-1 (5µm, 4,1 x 150 mm)
Detector	Detector UV-Visible de arreglo de diodos, PDA
Longitud de onda	260 nm
Presión del sistema (psi)	1600 ± 100

Las condiciones cromatográficas presentadas en la tabla XIV, se determinaron con patrones puros, lo que no garantiza que las mismas sean las apropiadas para el trabajo con fórmulas que contienen la combinación de Ibuprofeno y Ticolchicósido, ya que pueden existir otros compuestos presentes en las mismas, como lo son los excipientes, que pueden coeluir con los analitos de interés. Para abordar dicha situación se decidió preparar un material de referencia interno, debido principalmente a la no disponibilidad de un material de referencia certificado.

### **Preparación de material de referencia interno (MRI).**

Se elaboró un material de referencia interno, con la finalidad 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 <sup>28</sup>, no importando que marca comercial sea el medicamento si no que el método analítico sea capaz de identificar la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido presente en la tableta.

Para la preparación del MRI, se mezcló y homogeneizó 30 tabletas constituidas por 3 medicamentos de diferentes marcas comerciales, que contenían como sus principios activos Ibuprofeno y Tiocolchicósido a la misma concentración, estos productos se encontraban vigentes para la fecha de estudio, en actual comercialización y expendio en Venezuela: El contenido declarado de estos medicamentos era de 600 mg de Ibuprofeno y 4 mg de Tiocolchicósido.

Se utilizaron 10 tabletas por cada medicamento y para estudios posteriores se etiquetaron como medicamentos A, C y D para su diferenciación. El polvo de estas tabletas una vez homogeneizado fue transferido a un pesafiltros y almacenado dentro de un desecador, hasta el momento de su análisis.

### **Tratamiento del material de referencia interno**

Este procedimiento consistió en evaluar la efectividad de la extracción de los componentes en estudio de la muestra. Para ello, se empleó el MRI y se realizaron dos métodos de extracción:

### Método 1.

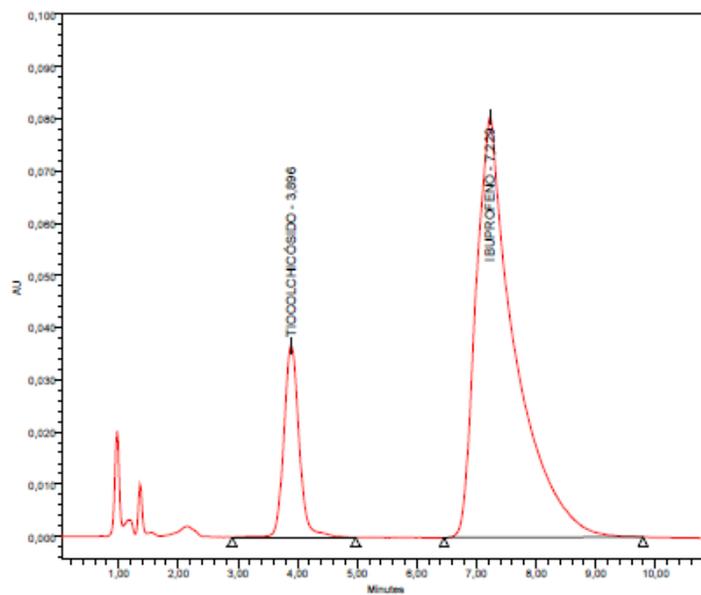
- Se pesó alrededor de 1/4 de MRI ( $\pm$  0,01 mg) y se añadió 7 mL aproximadamente de una mezcla acetonitrilo agua en composición (50:50) % v/v.
- Se agitó en el vórtex durante 5 minutos y se colocó en el ultrasonido por 5 minutos.
- Se enrasó a volumen en un balón de 10,00 mL.
- Se filtró con papel de filtro Whatman 40, donde se separó la fase líquida de los residuos sólidos (excipientes) y finalmente se realizó una dilución de 4,00 en 10,00 mL.
- Antes de inyectar la disolución en el cromatógrafo, esta se filtró con un disco de nylon de 0,45  $\mu$ m.

### Método 2.

- Se pesó alrededor de 1/4 de MRI ( $\pm$  0,01 mg) y se añadió 7 mL aproximadamente de una mezcla acetonitrilo agua en composición (50:50) % v/v.
- Se agitó en el vórtex durante 5 minutos y se colocó en el ultrasonido por 5 minutos.
- Se enrasó a volumen en un balón de 10,00 mL.
- La disolución se centrifugó por 10 minutos, separando la fase líquida de los residuos sólidos (excipientes).
- Se tomó del sobrenadante 4,00 mL de muestra y se diluyó a 10,00 mL.
- Antes de inyectar la disolución en el cromatógrafo, esta se filtró con un disco de nylon de 0,45  $\mu$ m.

Se decidió utilizar el método 2, ya que en el método 1 el proceso de filtración fue muy lento y por ser el metanol un compuesto bastante volátil se corre el riesgo de evaporación del solvente y por tanto un cambio de concentración de la solución resultante. Adicionalmente la solución final fue opalescente lo que indicaba la no existía de una buena filtración.

La figura XVII muestra el cromatograma obtenido para el análisis del MRI bajo las condiciones establecidas en la tabla XIV.



**Figura XVII.** Cromatograma correspondiente al material de referencia interno, tratado bajo las condiciones descritas.

Se puede observar dos bandas principales cuyos tiempos de retención coinciden con los obtenidos para el Ibuprofeno y el Tiocolchicósido, también se presentan varias

bandas minoritarias que no interfieren con los analitos de interés, lo cual indica que se pueden utilizar estas condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas.

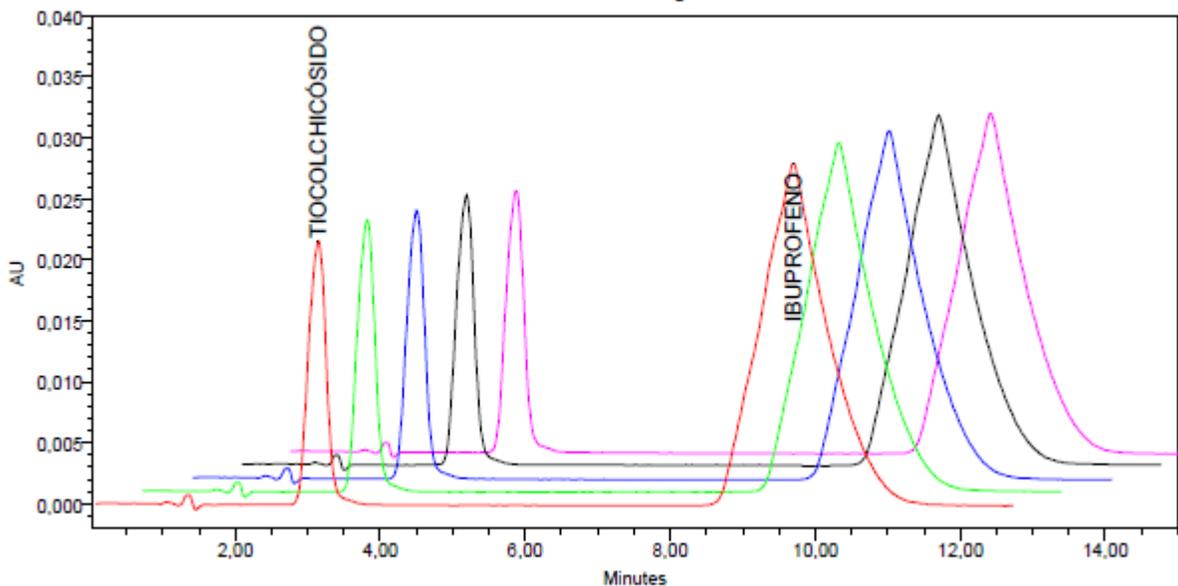
### VI.3. Evaluación de las figuras de mérito del sistema cromatográfico.

Bajo las condiciones cromatográficas determinadas anteriormente descrita en la tabla XIII, se procedió a inyectar 5 réplicas de un patrón combinado que contenía 6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Tiocolchicósido, con la idea de evaluar bajo el régimen de repetibilidad las figuras de mérito cromatográficas como lo son: tiempo de retención ( $t_R$ ), Área de la banda, factor de asimetría (As) y resolución (Rs). En la tabla XV se presentan los resultados. Conjunto de datos individuales son exhibidos en el apéndice A.

**Tabla XV.** Figura de mérito para el Ibuprofeno y el Tiocolchicósido.

	T <sub>R</sub> (minutos)		Área		Rs	As	
	TIO	IBU	TIO	IBU		TIO	IBU
Promedio	3,140	9,67	366527	1816495	5,29	1,16	1,18
Desviación estándar	0,004	0,03	5909	24544	0,09	0,02	0,02
Coefficiente de variación (%)	0,13	0,26	1,6	1,4	1,64	1,42	1,77

Los resultados obtenidos para los parámetros de tiempo de retención y área de los picos indican una dispersión poco significativa del conjunto de datos, al presentar coeficientes de variación menores al 2 %, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos, la USP establece valores menores al 2 % <sup>13</sup>. Demostrándose que existe repetibilidad con el método utilizado. También, los valores obtenidos en los cálculos de los factores cromatográficos son bastante aceptables, ya que cumple que los coeficientes de variación menores a 2 % en todos los cálculos. Se observa que el factor de asimetría fue de 1,16 para el Ticolchicósido y 1,18 para el Ibuprofeno, indicando que la banda cromatográfica tiene alta simetría, ya que el valor óptimo es 1,00 y el máximo aceptado es de 1,50 <sup>13</sup>.



**Figura XVIII.** Superposición de cromatogramas correspondiente a patrón combinado al 100% (5 inyecciones).

#### **VI.4. 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 <sup>16</sup>. Esto se llevó a cabo mediante estudios que permitieron evaluar las características de desempeño del método y conocer si estas cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

##### **VI.4.1. Linealidad.**

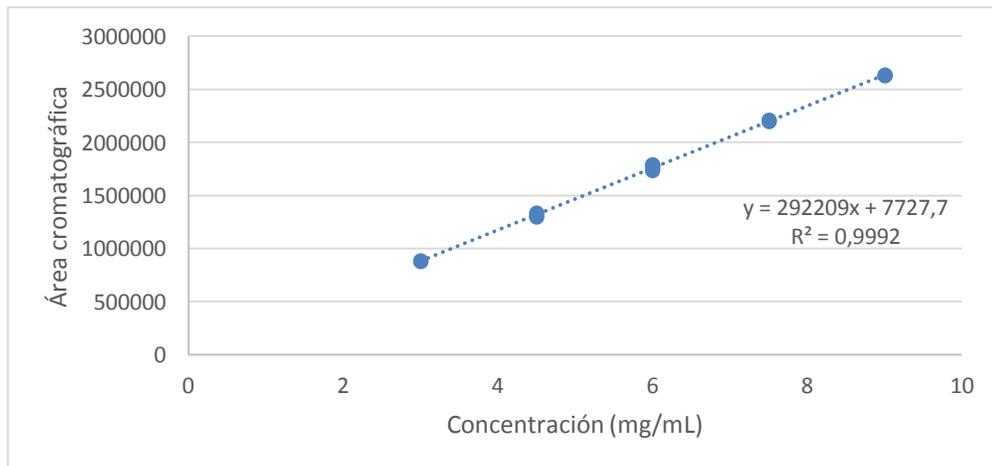
Para el estudio de la linealidad la ICH recomienda preparar soluciones de estándar de al menos 5 niveles de concentración, las cuales deben encontrarse en un intervalo mínimo de 80 % a 120 % de la concentración de referencia; este procedimiento deberá repetirse en tres días diferentes, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema <sup>17</sup>.

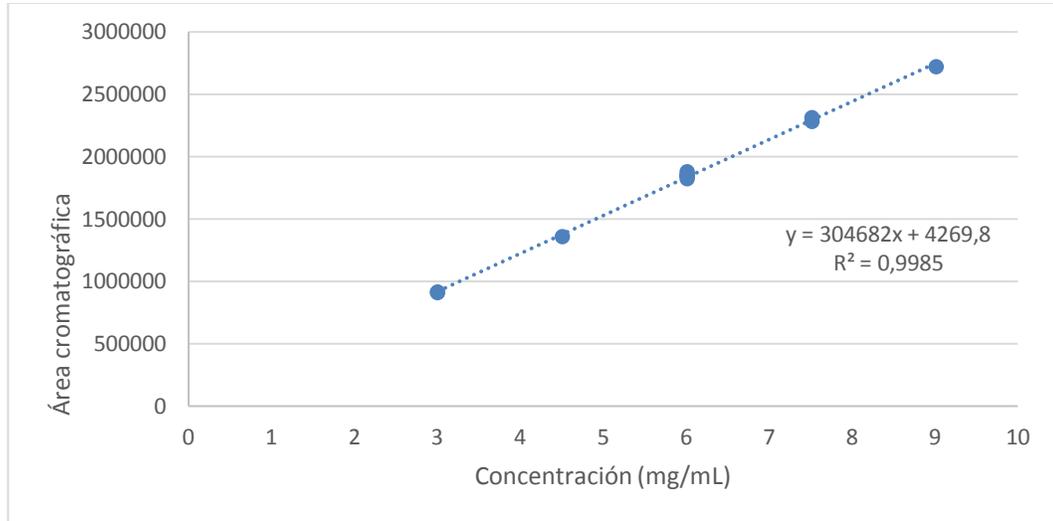
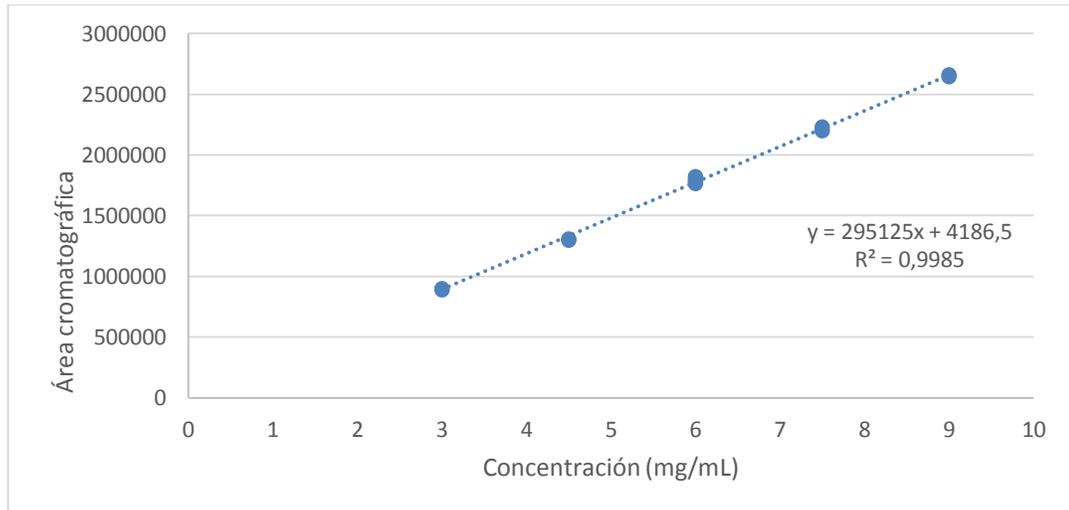
Durante el proceso de evaluación de la fase móvil se trabajó con patrones de 6 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Tiocolchicósido obteniendo una buena asimetría de pico como se demostró en los estudios anteriores, por lo que se puede suponer que estas concentraciones están dentro del rango lineal del equipo, es así que las mismas se fijaran como valores de referencia del 100 %. Los patrones se prepararon en un rango del 50 a 150% de esta referencia para asegurar así la determinación de la concentración de componentes de los medicamentos en estudio, aun cuando estos no cumplan los estándares de calidad.

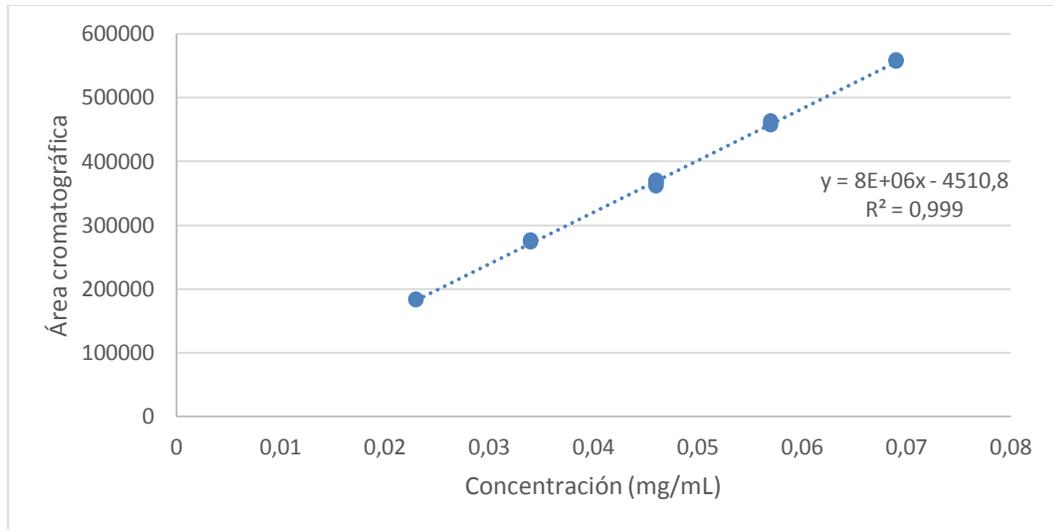
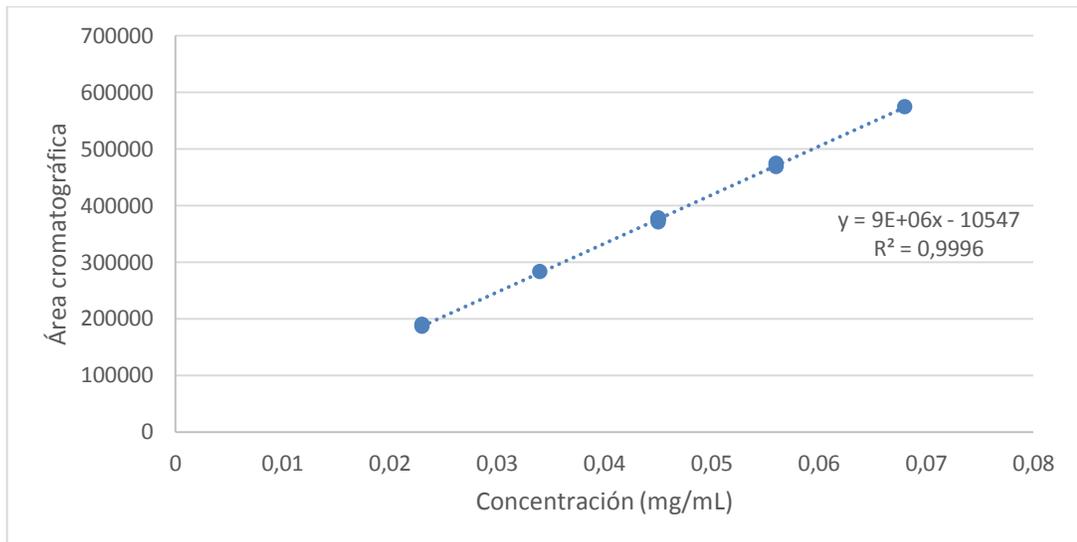
Se prepararon tres curvas de calibración en diferentes días. Cada curva estuvo compuesta por cinco concentraciones diferentes de patrones, ubicadas en un rango aproximado de 3,0 a 9,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,02 a 0,06 mg/mL de Ticolchicósido. Finalmente, se inyectó en el cromatógrafo cada patrón por duplicado y se construyó cada curva de calibración.

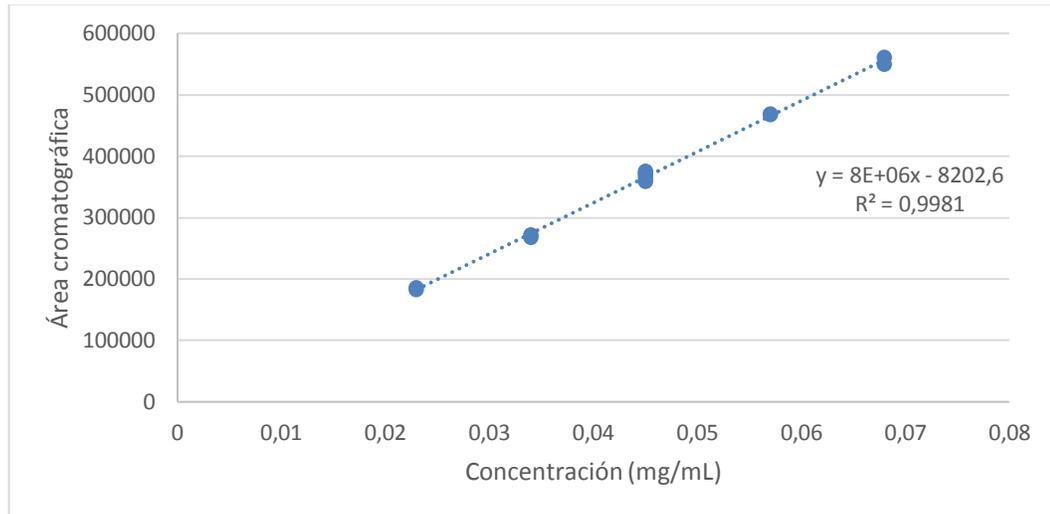
La regresión lineal fue calculada para cada analito y sus respectivas curvas de calibración fueron construidas trazando el área de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito correspondiente. Los datos detallados son exhibidos en el apéndice B. Las curvas de calibración de las tres regresiones lineales desarrolladas son presentadas a continuación, en los gráficos 1, 2 y 3, para el Ibuprofeno y en los gráficos 4, 5 y 6, para el Ticolchicósido.

**Gráfico 1. Linealidad día 1. Ibuprofeno.**



**Gráfico 2. Linealidad día 2. Ibuprofeno.****Gráfico 3. Linealidad día 3. Ibuprofeno.**

**Gráfico 4. Linealidad día 1. Ticolchicósido.****Gráfico 5. Linealidad día 2. Ticolchicósido.**

**Gráfico 6.** Linealidad día 3. Tiocolchicósido.

En las gráficas de las curvas de calibración, se puede observar una relación lineal aceptable entre las áreas y la concentración de ambos analitos en diferentes días de estudio, al obtenerse valores de  $r \geq 0,999$ ; que corresponden a  $r^2 > 0,998$ , que cumplen con los criterios de aceptación <sup>27</sup>.

Igualmente, es posible verificar la pendiente, a través de la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas, siendo el factor de respuesta (f) la relación entre la lectura o respuesta y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibración, (área obtenida del patrón/ concentración de analito) cuyo porcentaje del coeficientes de variación de los factores de respuesta  $\%CV_f$  no debe ser mayor del 5 % <sup>27</sup>. Estos coeficientes se calcularon para cada curva.

En la tabla XVI se muestran los criterios de aceptación para el Ibuprofeno y en la tabla XVII se muestran los criterios de aceptación para el Tiocolchicósido. Datos detallados se muestran en el apéndice C.

**Tabla XVI.** Criterios de aceptación para la linealidad del Ibuprofeno.

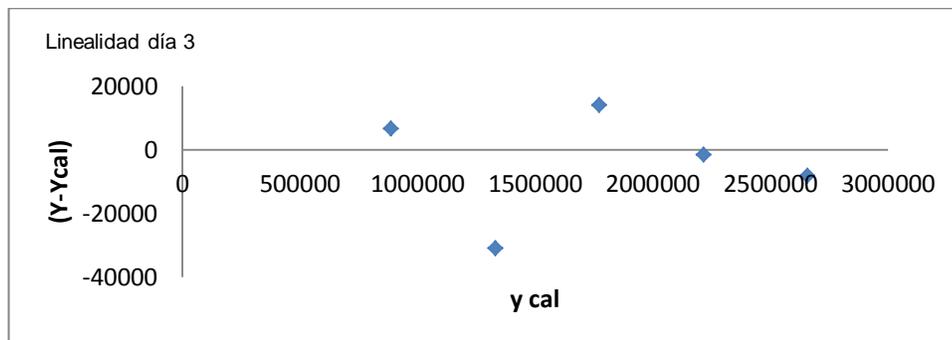
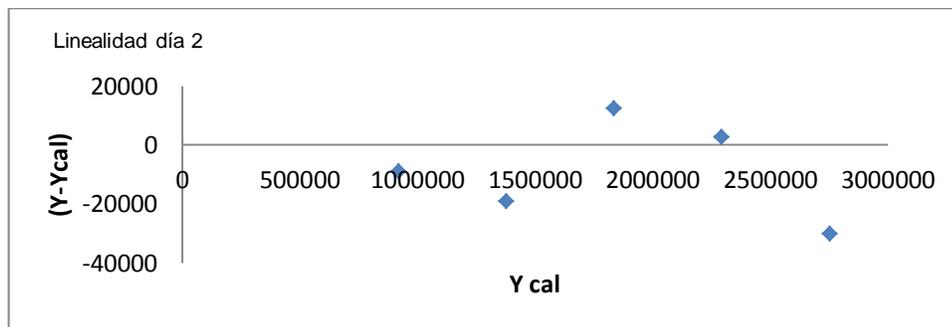
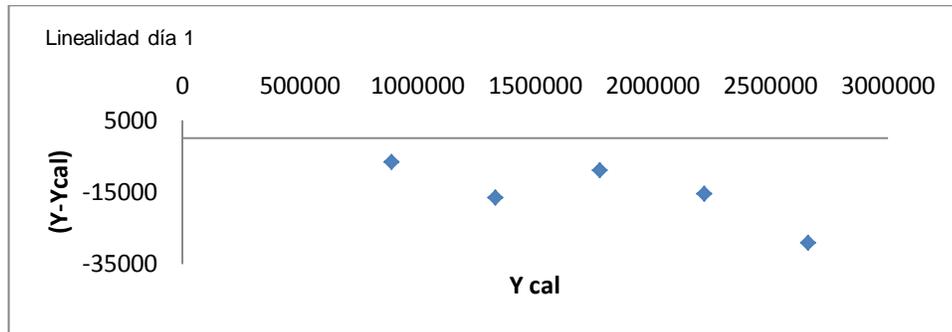
Parámetros de la linealidad	Curva de calibración		
	Día 1	Día 2	Día 3
Ecuación de la recta	$y = 295125x + 4186,5$ $S_b = 29988$ $S_a = 4712$	$y = 304682x - 4269,8$ $S_b = 30183$ $S_a = 4737$	$y = 295125x - 4186,5$ $S_b = 27648$ $S_a = 4349$
Coefficiente de correlación (r)	$r = 0,9996$	$r = 0,9993$	$r = 0,9990$
% CV <sub>f</sub>	0,33	0,85	1,29

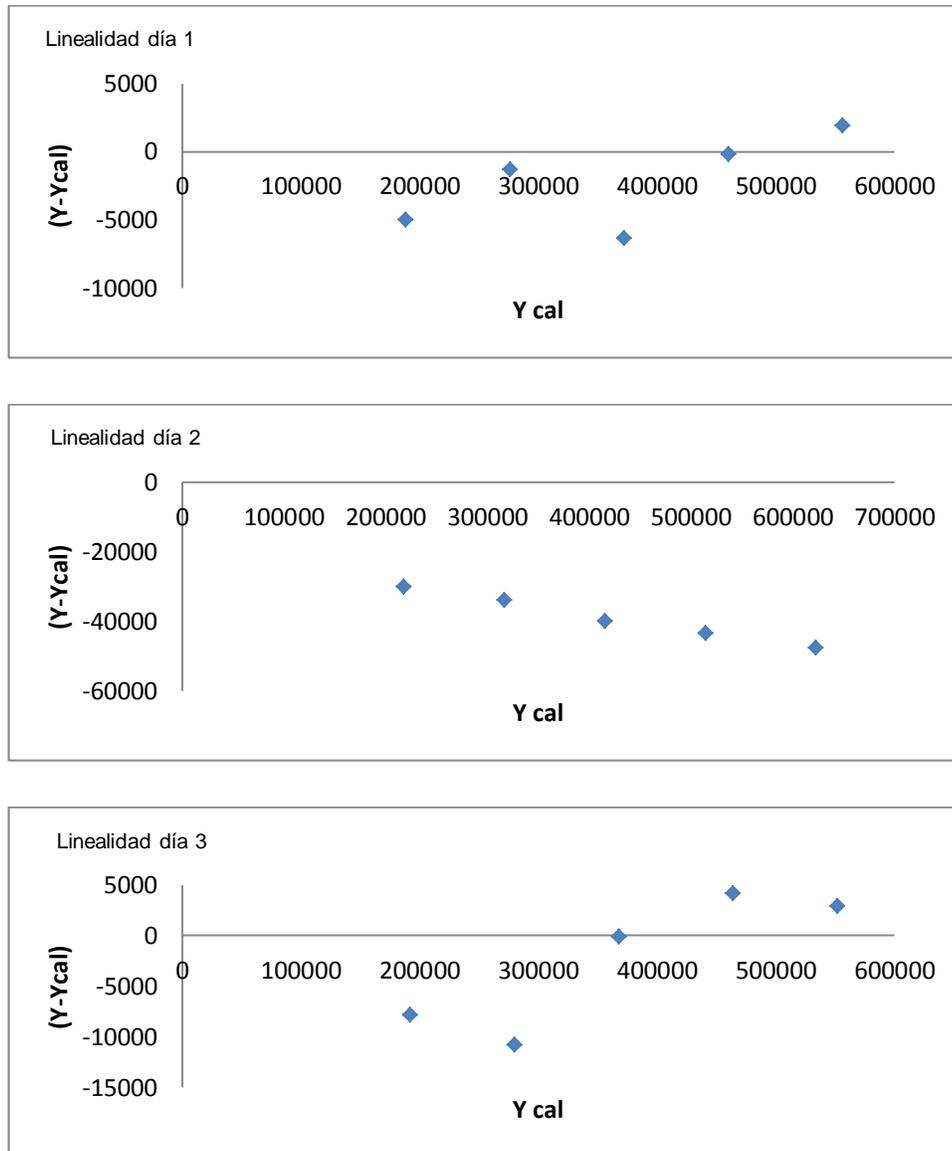
**Tabla XVII.** Criterios de aceptación para la linealidad del Tiocolchicósido.

Parámetros de la linealidad	Curva de calibración		
	Día 1	Día 2	Día 3
Ecuación de la recta	$y = 8000000x - 4510,8$ $S_b = 133520$ $S_a = 6513$	$y = 9000000x - 10547$ $S_b = 1441059$ $S_a = 68358$	$y = 8000000x - 8202,6$ $S_b = 230212$ $S_a = 11013$
Coefficiente de correlación (r)	r = 0,9996	r = 0,9996	r = 0,9990
% CV <sub>f</sub>	0,82	1,39	1,53

Se obtuvo un %CV<sub>f</sub> menor al 5 %, en todas las curvas de calibración, tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicósido, es decir que existe una correlación lineal significativa entre las áreas obtenidas y la concentración de los analitos, lo que indica que el método cumple con el criterio de aceptación para el análisis <sup>27</sup>.

Se realizó el análisis de residuales, para la búsqueda de anomalías en la regresión, en los gráficos 7 y 8 se muestran las representaciones gráficas de los residuos contra los valores de y calculado, del Ibuprofeno y Tiocolchicósido, respectivamente.

**Gráfico 7. Análisis de residuales. Ibuprofeno.**

**Gráfico 8.** Análisis de residuales. Tiocolchicósido.

En los resultados del análisis de residuales se puede observar que se utilizó el modelo correcto de calibración, ya que los residuales permanecen aproximadamente uniformes

con el aumento de la medida (Y calculado), distribuyéndose normalmente alrededor de cero, indicando que el ajuste lineal por mínimos cuadrados para diferentes días y para los dos principios activos es bastante aceptable, obteniéndose una distribución satisfactoria<sup>30</sup>.

Es por esto que se puede decir que la linealidad no se vio afectada por la variabilidad de las condiciones operativas y ambientales dadas en los diferentes días de estudio.

#### **VI.4.2. 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<sup>16</sup>. En el caso del análisis de un fármaco, resulta de gran utilidad contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación<sup>16</sup>. Al no contar con este último, fue necesario realizar un ensayo de degradación artificial que consistía en pesar alrededor de 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:

**Fotólisis:** se expuso a radiación UV durante 3 días.

**Hidrólisis ácida:** se le añadió 1,00 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1N. Se dejó en reposo por 3 días.

**Hidrólisis básica:** se le añadió 1,00 mL de Hidróxido de sodio (NaOH) 1N. Se dejó en reposo por 3 días.

**Oxidación:** se le añadió 1,00 mL de Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 35 %. Se dejó en reposo por 3 días.

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

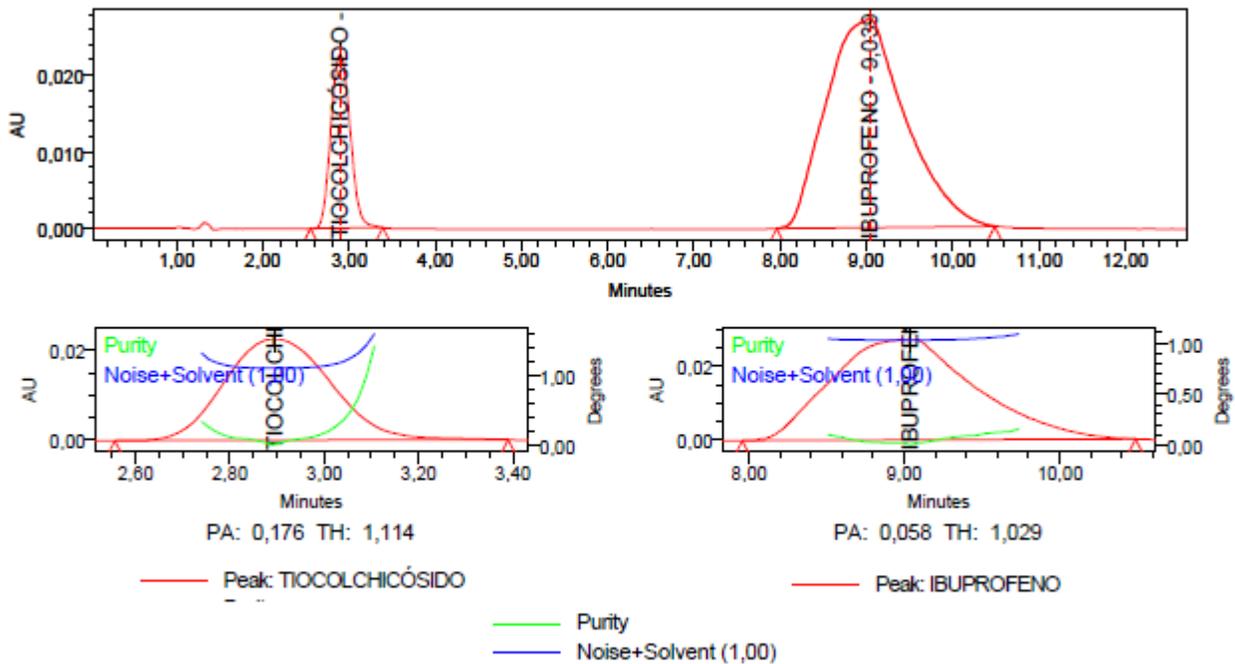
Una vez concluido el tiempo de exposición se aplicó el procedimiento tal como se especifica en la preparación del material de referencia interno. Y adicionalmente se preparó un patrón combinado al 100% en concentración 6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Ticolchicósido. Y la muestra control, que 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.

### **Patrón control.**

A partir de un patrón combinado de 6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Ticolchicósido, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XIX. Donde se puede apreciar que el pico de Ticolchicósido eluye a 2,895 minutos y el Ibuprofeno eluye a 9,038 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso

para el Tiocolchicósido el valor de PA= 0,176 es menor que TH= 1,114 y para el Ibuprofeno el valor de PA= 0,058 es menor que TH= 1,029.



**Figura XIX.** Cromatograma y gráficos de pureza de patrón control.

### Muestra control.

Con la muestra recién preparada, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XX. Donde se puede apreciar que el pico de Tiocolchicósido eluye a 2,884 minutos y el Ibuprofeno eluye a 9,027 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el Tiocolchicósido el valor de PA= 0,673 es menor que TH= 1,141 y para el Ibuprofeno el valor de PA= 0,039 es menor que TH= 1,017.

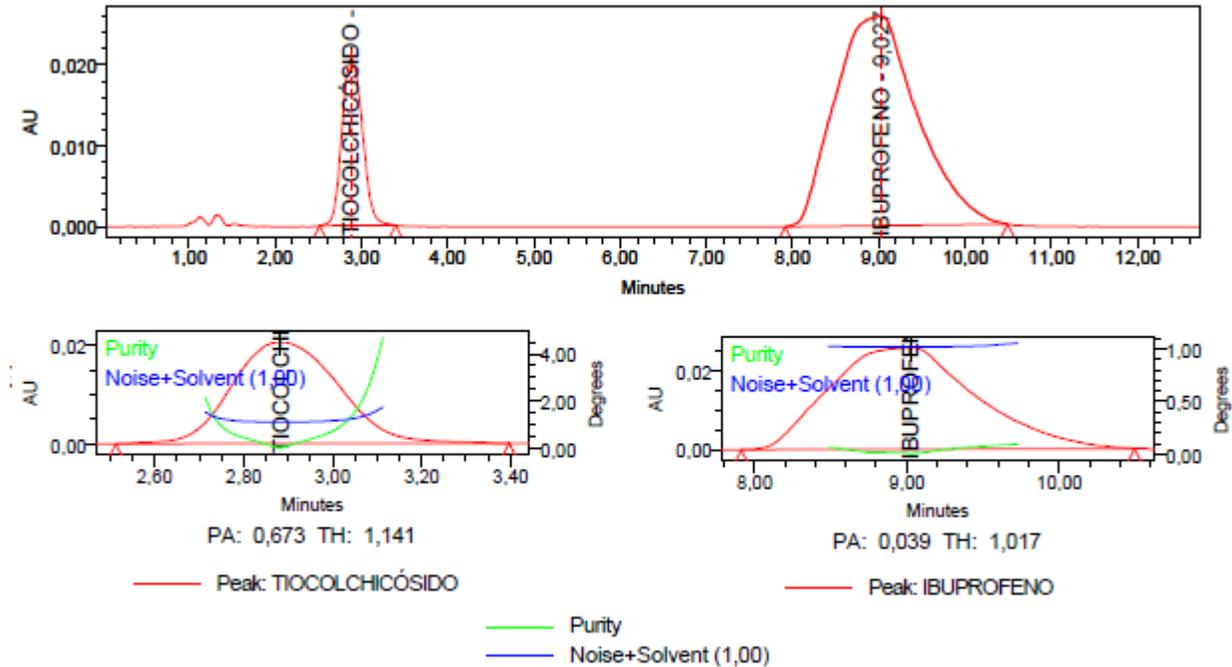
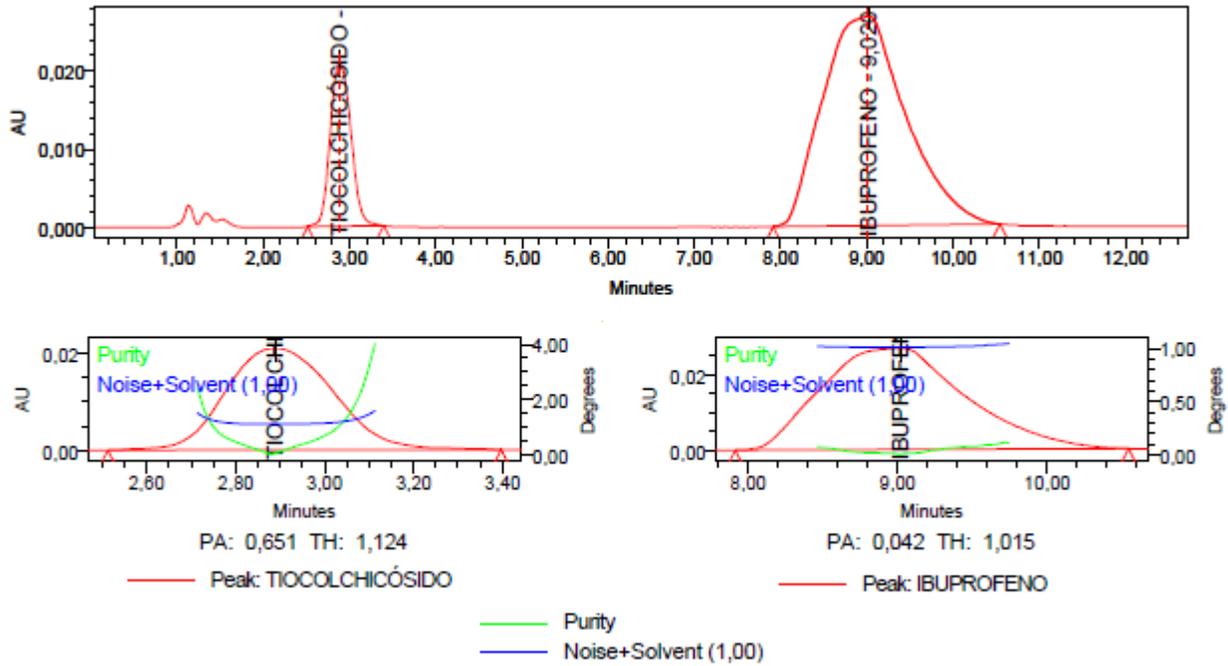


Figura XX. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra control.

### Muestra en reposo por 3 días.

Con la muestra en reposo por 3 días, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XXI. Donde se puede apreciar que el pico de Ticolchicósido eluye a 2,888 minutos y el Ibuprofeno eluye a 9,020 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el Ticolchicósido el valor de PA= 0,651 es menor que TH= 1,124 y para el Ibuprofeno el valor de PA= 0,042 es menor que TH= 1,015.

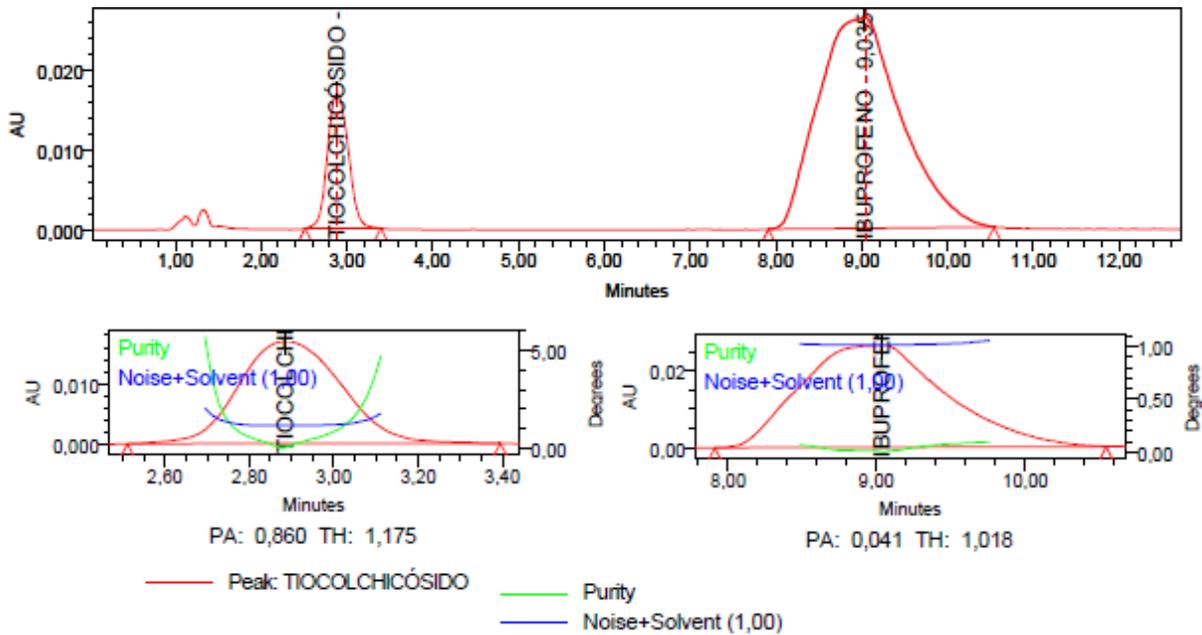


**Figura XXI.** Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en reposo por 3 días.

Al comparar las áreas de las señales cromatográficas del Ibuprofeno y el Tiocolchicosido en la muestra control preparada al instante y tres días después de su preparación, se observó un ligero aumento en el área de la banda cromatográfica del Ibuprofeno y Tiocolchicosido. Pero al evaluar su señal de pureza tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicosido no se observó presencia de coelución de otros compuestos. Por lo que se puede justificar que esta variación en las áreas puede ser causada por evaporación del disolvente, ya que no se encuentran impurezas espectrales.

## Fotólisis.

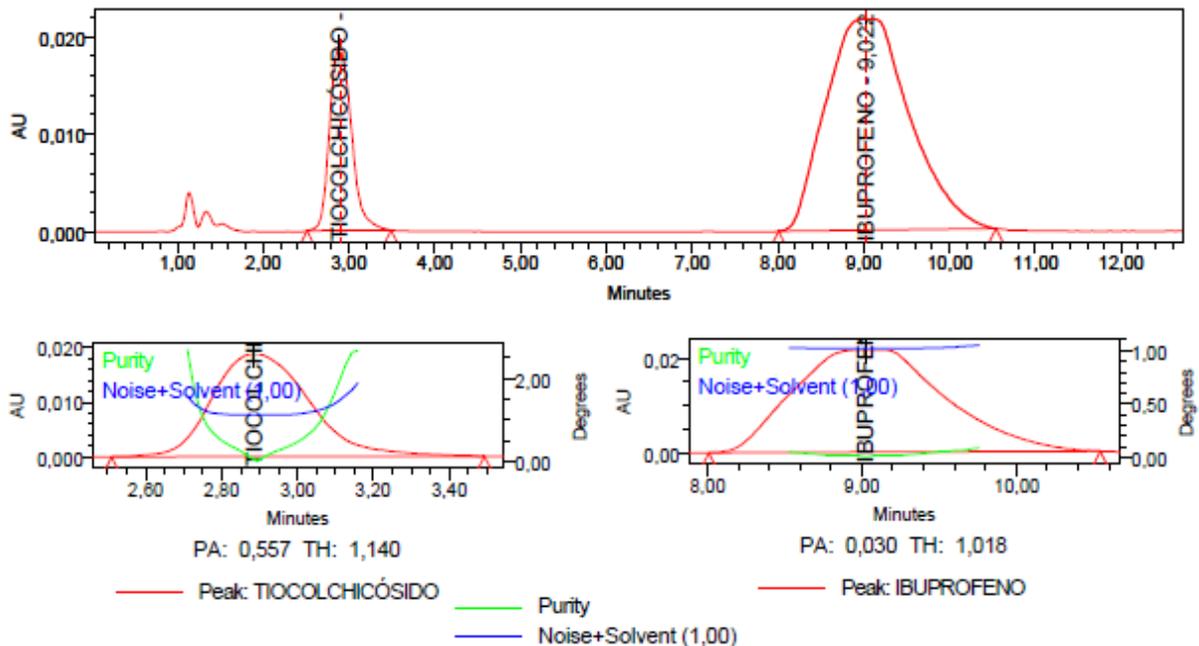
Después de 3 días de haber expuesto la muestra a radiación UV, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XXII. Donde se puede apreciar que el pico de Ticolchicósido eluye a 2,886 minutos y el Ibuprofeno eluye a 9,035 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el Ticolchicósido el valor de  $PA = 0,860$  es menor que  $TH = 1,175$  y para el Ibuprofeno el valor de  $PA = 0,041$  es menor que  $TH = 1,018$ .



**Figura XXII.** Cromatograma y gráficos de pureza de muestra sometida a fotólisis por 3 días.

### Hidrólisis ácida.

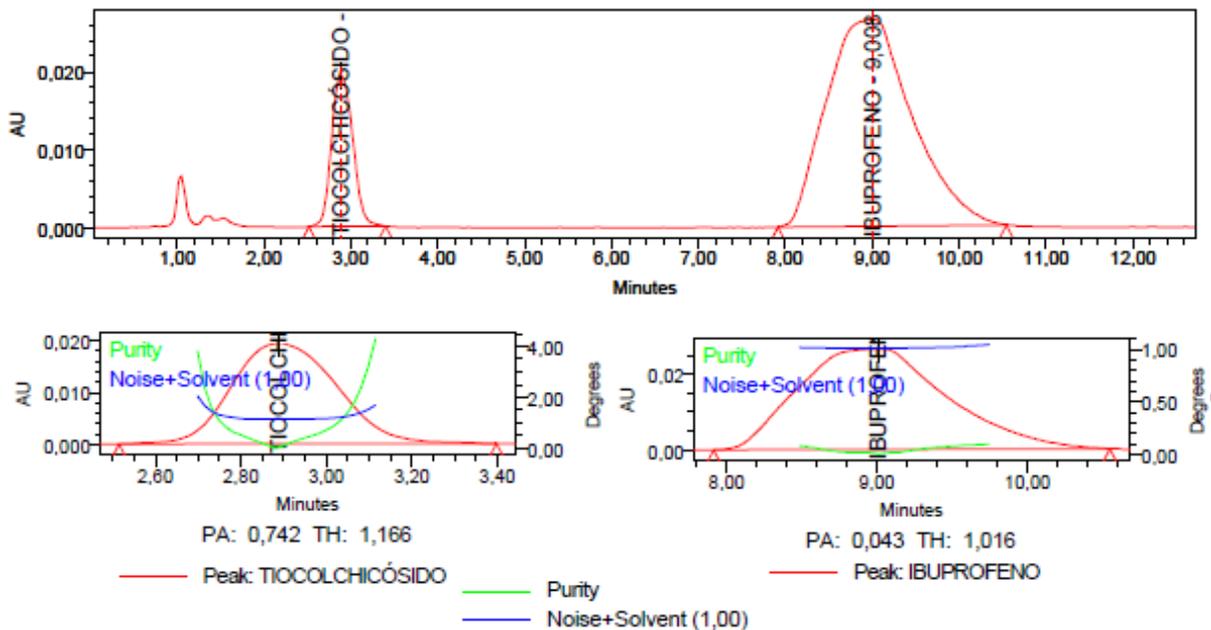
Con la muestra en presencia de ácido clorhídrico 1N por 3 días, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XXIII. Donde se puede apreciar que el pico de Ticolchicósido eluye a 2,887 minutos y el Ibuprofeno eluye a 9,022 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el Ticolchicósido el valor de  $PA = 0,557$  es menor que  $TH = 1,140$  y para el Ibuprofeno el valor de  $PA = 0,030$  es menor que  $TH = 1,018$ .



**Figura XXIII.** Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en presencia de ácido clorhídrico por 3 días.

### Hidrólisis básica.

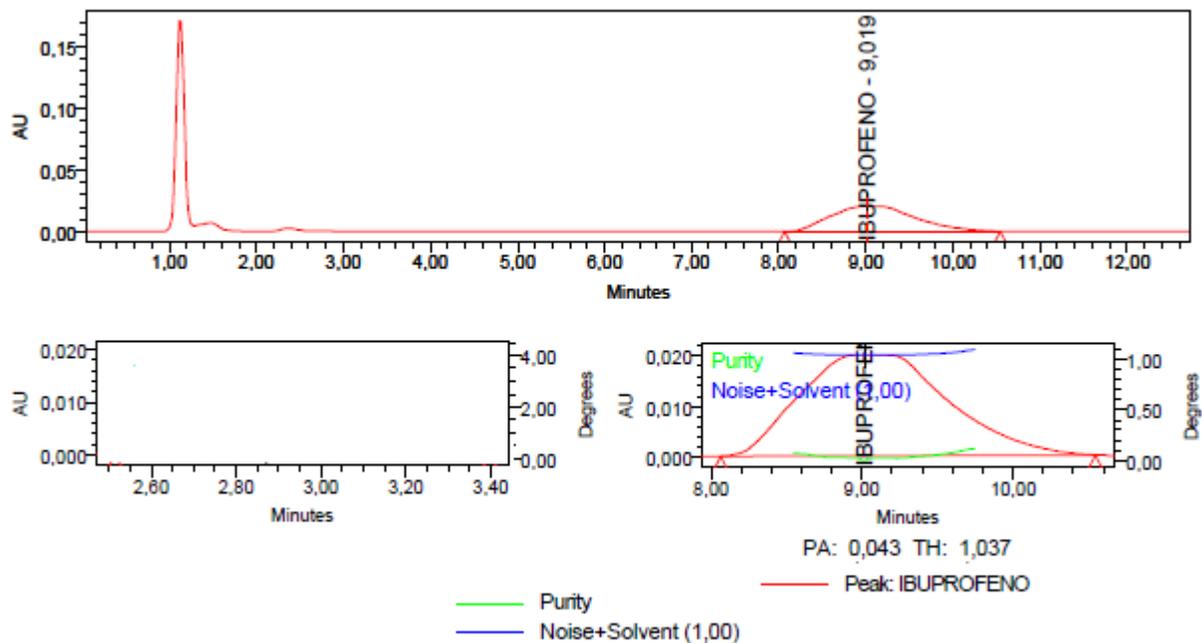
Con la muestra en presencia de hidróxido de sodio 1N por 3 días, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XXIV. Donde se puede apreciar que el pico de Ticolchicósido eluye a 2,889 minutos y el Ibuprofeno eluye a 9,008 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el Ticolchicósido el valor de PA= 0,742 es menor que TH= 1,166 y para el Ibuprofeno el valor de PA= 0,043 es menor que TH= 1,016.



**Figura XXIV.** Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en presencia de hidróxido de sodio por 3 días.

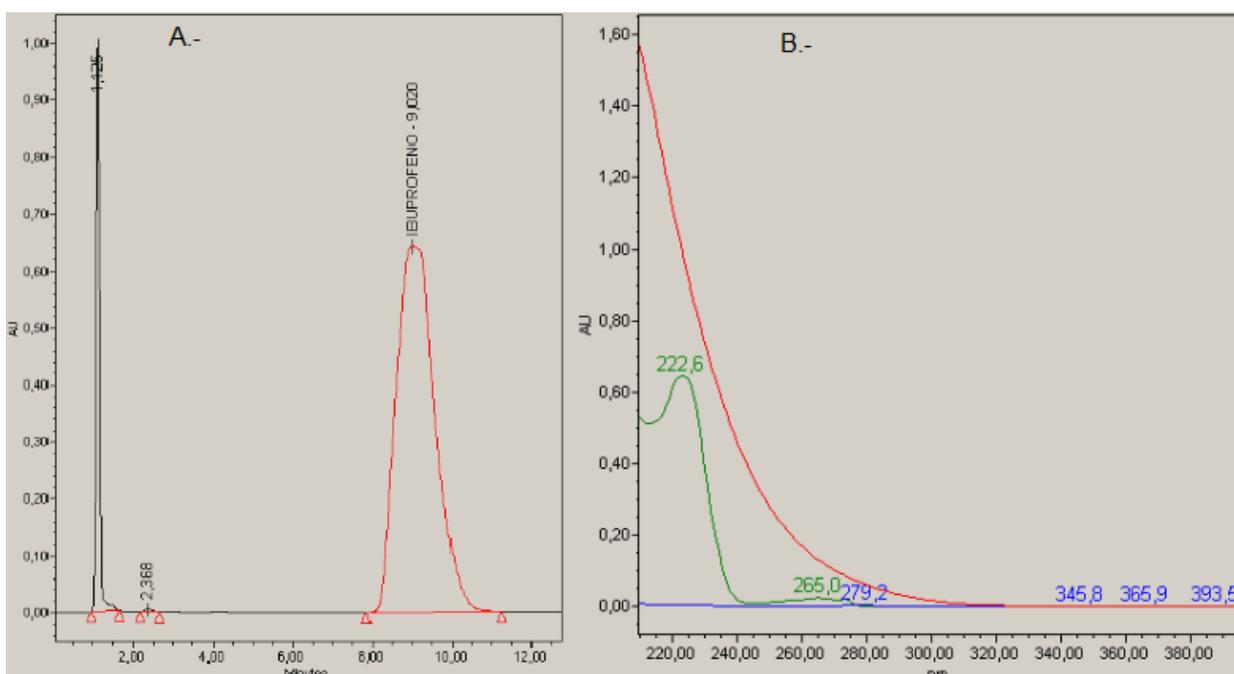
### Estrés oxidativo.

Con la muestra en presencia de peróxido de hidrogeno al 35 % por 3 días, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XXV. Se observa una señal en 9,019 minutos correspondiente al Ibuprofeno, pero la señal correspondiente al Ticolchicósido no se evidencia, esto indica que la muestra se degrada. El Ibuprofeno no posee especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso el valor de PA= 0,043 es menor que TH= 1,037.



**Figura XXV.** Cromatograma y gráficos de pureza de muestra en presencia de peróxido de hidrogeno por 3 días.

Para el caso del Ticolchicósido que no se observó presencia de señal es importante mencionar que existe en el cromatograma dos señales adicionales a la del Ibuprofeno, que comparándolos con su espectro de absorción molecular se puede observar que no pertenecen al Ticolchicósido. En la figura XXVI se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra sometida a estrés oxidativo y los espectros de absorción molecular para las tres señales observadas.

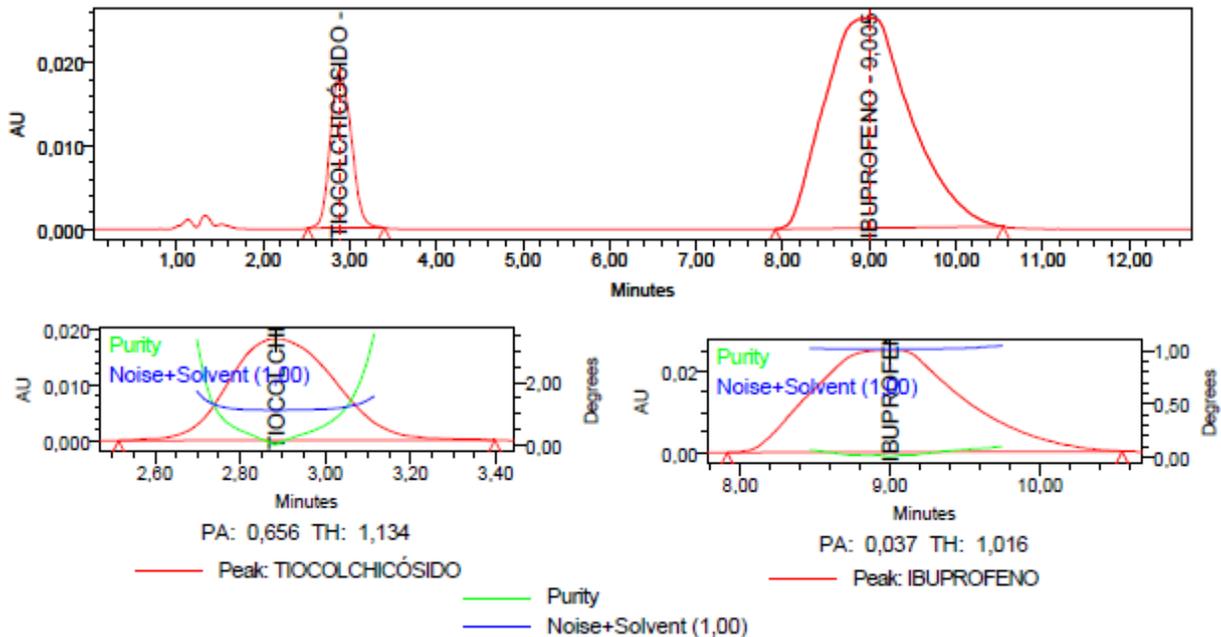


**Figura XXVI.** A.- Cromatograma y B.- Espectro de absorción molecular correspondiente a la muestra en presencia de peróxido de hidrogeno por 3 días.

Se puede observar que el primer degradado tiene un tiempo de elución de 1,125 minutos y no presenta un máximo de absorción en la región del UV y el segundo degradado tiene un tiempo de elución de 2,368 minutos y presenta un máximo de absorción 279,2 nm. Se puede concluir que al añadir peróxido de hidrógeno el Ticolchicósido sufre proceso de oxidación a través del tiempo.

## Termólisis.

Con la muestra sometida a termólisis (60°C por 3 horas), se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura XXVII. Donde se puede apreciar que el pico de Tiocolchicósido eluye a 2,886 minutos y el Ibuprofeno eluye a 9,005 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el Tiocolchicósido el valor de PA= 0,656 es menor que TH= 1,134 y para el Ibuprofeno el valor de PA= 0,037 es menor que TH= 1,016.



**Figura XXVII.** Cromatograma y gráficos de pureza de muestra sometida a termólisis por 3 horas.

La evaluación de la especificidad del método cromatográfico para la separación simultánea de Ibuprofeno y Ticolchicósido bajo las condiciones cromatográficas encontradas, indica que el método es específico bajo las condiciones sometidas para el Ibuprofeno, en cambio para el Ticolchicósido se encontró que en presencia de peróxido de hidrogeno produce una oxidación generando degradados. En la tabla XVIII y tabla XIX se presentan los resultados obtenidos para la especificidad de cada principio activo.

**Tabla XVIII.** Especificidad del Ibuprofeno.

Condición	PA	TH	Concentración (mg/tab)	% respecto a lo declarado	% de degradado
Muestra control	0,039	1,017	593,9	99,0	.....
Muestra (3 días)	0,042	1,015	617,9	103,0	-4,1
Fotólisis	0,041	1,018	612,9	102,2	-3,2
Hidrólisis acida	0,030	1,018	508,4	84,7	14,4
Hidrólisis básica	0,043	1,016	625,1	104,2	-5,3
Oxidación	0,043	1,037	473,1	78,9	20,3
Termólisis	0,037	1,016	600,9	100,2	-1,2

**Tabla XIX.** Especificidad del Ticolchicósido.

Condición	PA	TH	Concentración (mg/tab)	% respecto a lo declarado	% de degradado
Muestra control	0,673	1,141	4,28	107,0	.....
Muestra (3 días)	0,651	1,124	4,37	109,3	-2,1
Fotólisis	0,860	1,175	3,61	90,3	15,7
Hidrólisis ácida	0,557	1,14	4,16	104,0	2,8
Hidrólisis básica	0,742	1,166	4,15	103,8	3,0
Oxidación	.....	.....	.....	.....	.....
Termólisis	0,656	1,134	3,97	99,3	7,2

En las tablas XVIII y XIX 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 de grado es menor al 20 % de la concentración inicial, que es lo recomendado para que no exista interferencia significativa <sup>12</sup>, lo que nos indica que esos degradados no interfieren con nuestros picos de interés, dando la condición de especificidad al método, que a pesar de la degradación no existen señales superpuesta sobre esos picos. Sin embargo, para la condición de oxidación se observa para el Ibuprofeno un porcentaje de degradado de 20,3 %, existiendo una pequeña interferencia y para el caso del Ticolchicósido no se observó presencia de señal, 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 el 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 el

Ibuprofeno sufrió degradación bajo estas condiciones. De igual manera, el método es específico ya que permite evaluar de manera inequívoca los principios activos en estudio.

#### **VI.4.3. Precisión.**

La precisión del método fue evaluada mediante las determinaciones de precisión del sistema, 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) <sup>16</sup>.

#### **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. Con ello, se obtuvo para el Ibuprofeno un (Tr) de 9,67 minutos y un CV de 0,26 % y para el Tiocolchicósido un (Tr) de 3,140 minutos y un CV de 0,13 %; mientras que, el promedio obtenido de las áreas fue de 24543,7 con un CV igual a 1,4 % para el Ibuprofeno y 5909,4 con un CV igual a 1,6 % para el Tiocolchicósido (Ver tabla XX).

**Tabla XX.** Precisión de sistema cromatográfica.

Numero de inyecciones	t <sub>R</sub> (minutos)		Área	
	TIO	IBU	TIO	IBU
1	3,145	9,70	360296	1788893
2	3,142	9,69	359855	1790694
3	3,136	9,65	370106	1829951
4	3,135	9,64	371024	1835227
5	3,139	9,66	371355	1837710
Promedio	3,140	9,67	366527	1816495
Desviación estándar	0,004	0,03	5909	24544
Coefficiente de variación	0,130	0,26	1,6	1,4

Los valores de los coeficientes de variación tanto del tiempo de retención como para las áreas del patrón son menores al 2 %, lo que representa una conformidad en este ámbito <sup>16</sup>, indicando que el sistema cromatográfico estaba apto para ser utilizado.

### **Repetibilidad.**

Se evaluó mediante la preparación de 6 muestras al 100 % (6,0 mg/mL de Ibuprofeno y 0,04 mg/mL de Ticolchicósido), 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 Ticolchicósido en (mg/tab).

**Tabla XXI.** Precisión del método para el Ibuprofeno.

Réplicas de muestras	Cantidad de muestra $\pm 0,1$ (mg)	Áreas	Cantidad de Ibuprofeno (mg/tab)	Promedio de Cantidad de Ibuprofeno (mg/tab)	% CV
1	223,6	1787360	598,88	596,0	0,7
	223,6	1769300	592,79		
2	223,3	1742282	584,46	592,0	1,8
	223,3	1786297	599,33		
3	223,6	1790344	599,89	605,0	1,2
	223,6	1820255	609,98		
4	223,8	1771327	592,94	587,0	1,5
	223,8	1734239	580,44		
5	223,5	1770525	593,47	601,0	1,8
	223,5	1816759	609,07		
6	223,5	1757094	588,93	585,0	1,0
	223,5	1733325	580,91		
			Promedio	594,0	
			Desviación estándar	8,0	
			% CV	1,3	

**Tabla XXII.** Precisión del método para el Tiocolchicósido.

Réplicas de muestras	(Cantidad de muestra $\pm 0,1$ ) mg	Áreas	Cantidad de Tiocolchicósido (mg/tab)	Promedio de Cantidad de Tiocolchicósido (mg/tab)	% CV
1	223,6	325516	3,94	4,00	0,5
	223,6	328208	3,97		
2	223,3	321724	3,90	3,90	0,4
	223,3	323574	3,92		
3	223,6	322017	3,90	3,90	0,9
	223,6	326171	3,95		
4	223,8	325873	3,94	3,90	2,0
	223,8	316448	3,83		
5	223,5	322329	3,91	4,00	1,8
	223,5	331065	4,01		
6	223,5	321430	3,89	3,80	1,7
	223,5	313839	3,80		
Promedio				3,91	
Desviación estándar				0,04	
% CV				1,12	

**Tabla XXIII.** Límite de confianza al 95% para la repetibilidad.

Muestra	Ibuprofeno		Tiocolchicósido	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior
1	591	600	3,93	3,98
2	581	603	3,90	3,93
3	598	612	3,89	3,96
4	577	596	3,80	3,97
5	590	613	3,89	4,03
6	579	591	3,78	3,91
Promedio:	586	603	3,87	3,96

La evaluación de la precisión del método demostró que 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. También, se comprobó la repetibilidad a través de los límites de confianza, indicando que el contenido de los principios activos en el producto terminado se encontraban dentro de una probabilidad del 95%, utilizando un valor de  $t = 2,571$  para 5 grados de libertad a una significación del 95% <sup>27</sup>.

### **Precisión intermedia.**

La precisión intermedia se puede evaluar realizando variaciones en alguna de las siguientes condiciones días, analistas y equipos <sup>16</sup>.

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 Ticolchicósido en mg/tab.

**Tabla XXIV.** Precisión intermedia para el Ibuprofeno.

Réplica de muestra	Réplica de inyección	Cantidad de Ibuprofeno (mg/tab)		
		Día 1	Día 2	Día 3
1	1	609	581	596
	2	606	583	589
2	1	604	594	603
	2	621	598	617
3	1	601	586	604
	2	599	600	609
Promedio		607	590	603
s		8	8	10
CV (%)		1,3	1,4	1,6

**Tabla XXV.** Precisión intermedia para el Ticolchicósido.

Réplica de muestra	Réplica de inyección	Cantidad de Ticolchicósido (mg/tab)		
		Día 1	Día 2	Día 3
1	1	4,09	3,95	4,07
	2	4,03	3,99	4,01
2	1	4,11	3,90	4,04
	2	4,15	3,98	4,07
3	1	4,04	3,89	4,04
	2	4,03	3,96	4,05
Promedio		4,08	3,95	4,05
s		0,05	0,04	0,02
CV (%)		1,22	1,05	0,56

**Tabla XXVI.** Límite de confianza al 95% para la precisión intermedia.

Muestra	Ibuprofeno		Tiocolchicósido	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior
1	587	627	3,95	4,20
2	570	611	3,84	4,05
3	579	627	3,94	4,15
Promedio:	578	621	3,91	4,13

A pesar que se evidencian valores de concentración por tableta diferentes en cada día, tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicósido, 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 el Ibuprofeno, y para el 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 <sup>16</sup>. 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.

Se comprobó la precisión intermedia de dos maneras, una a través de los límites de confianza, indicando que el contenido de los principios activos en el producto terminado se encontraban dentro de una probabilidad del 95%, utilizando un valor de  $t = 4,303$  para 2 grados de libertad a una significación del 95% <sup>27</sup>. Y otra manera, a través de la ecuación de Horwitz, determinando el coeficiente de variación de Horwitz y

comparando con el coeficiente de variación obtenido en el análisis. En la tabla XXIII se observan los resultados para el Ibuprofeno cuyo valor promedio fue 600 mg/tab y un coeficiente de variación de 1,5 %, y en la tabla XXIV se observan los resultados para el Tiocolchicósido cuyo valor promedio fue 4,03 mg/tab y un coeficiente de variación de 1,6%.

Se determinó el coeficiente de variación ( $CV_H$ ) propuesto por Horwitz:

$$CV_H = 2^{(1-0.5) \log C}$$

Dónde: C = fracción del analito en la muestra (C= g analito/ g muestra).

Se obtuvo para el Ibuprofeno un  $CV_H = 1,6$  y para el Tiocolchicósido un  $CV_H = 0,8$ .

El valor de Coeficiente de variación obtenido se comparó mediante el parámetro Horrat<sup>29</sup>.

$$\text{Horrat} = CV / CV_H$$

Se obtuvo para el Ibuprofeno un Horrat = 0,9 y para el Tiocolchicósido un Horrat = 2,0. Por lo tanto, el método tiene valores aceptables de precisión intermedia, ya que el valor obtenido en el parámetro Horrat es igual o menor a 2; demostrando así que el método es preciso<sup>29</sup>.

#### **VI.4.4. 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 <sup>16</sup>. Finalmente se calcula el porcentaje de recuperación como medida de la exactitud:

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

Se prepararon muestras por triplicado en un rango de concentración de 75, 100 y 125%, para cada nivel de concentración se pesó el MRI en un equivalente a  $\frac{1}{4}$  del peso promedio ( $\approx 223,0$  mg), dando lugar a 9 muestras. Se realizó el procedimiento explicado en el tratamiento del MRI, pero después de centrifugar del sobrenadante de cada muestra, es decir para cada nivel, se tomaron dos alícuotas de 2,00 mL y fueron transferidas a dos balones aforados de 10,00 mL uno de ellos sería fortificada con la cantidad de patrón y el otro sería la muestra sin fortificar. Después se preparó una solución patrón combinada de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en concentración de 15,0106 mg/mL y 0,1054 mg/mL respectivamente y se añadió 1,00 mL, 2,00 mL y 3,00 mL a las muestras para fortificarlas en los niveles de concentración 75% 100% y 125% respectivamente.

Las concentraciones de las muestras fueron calculadas utilizando una curva de calibración realizada el mismo día. En la tabla XXVII y tabla XXVIII se muestran las concentraciones fortificadas y sin fortificar para el Ibuprofeno y el Tiocolchicósido respectivamente.

**Tabla XXVII.** Concentraciones fortificadas y sin fortificar para el Ibuprofeno.

Nivel de concentración	Réplica	Concentración en mg/mL			
		Sin fortificar	Fortificadas		
75%	A-1	2,6624	4,1628		
	B-1	2,8257	4,3068		
	C-1	2,5199	4,4613		
100%	A-2	2,5592		5,5517	
	B-2	2,6057		5,6538	
	C-2	2,6917		5,6405	
125%	A-3	2,6861			7,1563
	B-3	2,6964			7,1314
	C-3	2,4432			6,9502

**Tabla XXVIII.** Concentraciones fortificadas y sin fortificar para el Tiocolchicósido.

Nivel de concentración	Réplica	Concentración en mg/mL			
		Sin fortificar	Fortificadas		
75%	A-1	0,0140	0,0245		
	B-1	0,0130	0,0235		
	C-1	0,0124	0,0259		
100%	A-2	0,0129		0,0339	
	B-2	0,0138		0,0352	
	C-2	0,0131		0,0339	
125%	A-3	0,0139			0,0459
	B-3	0,0140			0,0453
	C-3	0,0124			0,0445

Los porcentajes de recuperación para el Ibuprofeno y Tiocolchicósido se muestran en la tabla XXIX y tabla XXX respectivamente.

**Tabla XXIX.** Porcentaje de recuperación para el Ibuprofeno.

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

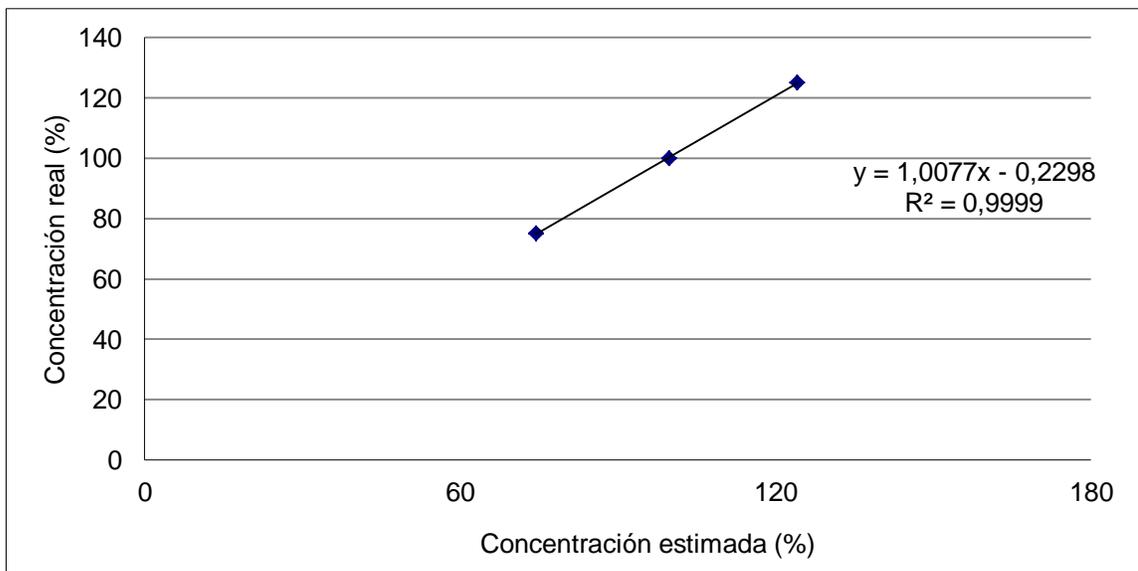
**Tabla XXX.** Porcentaje de recuperación para el Tiocolchicósido.

% recuperación	Promedio	Desviación estándar	% encontrado	Nivel de concentración
99,33 99,22	99,28	0,08	74,46	75%
99,9 101,6 98,5	100,0	1,6	100,0	100%
101,2 98,9 101,3	100,5	1,4	125,6	125%

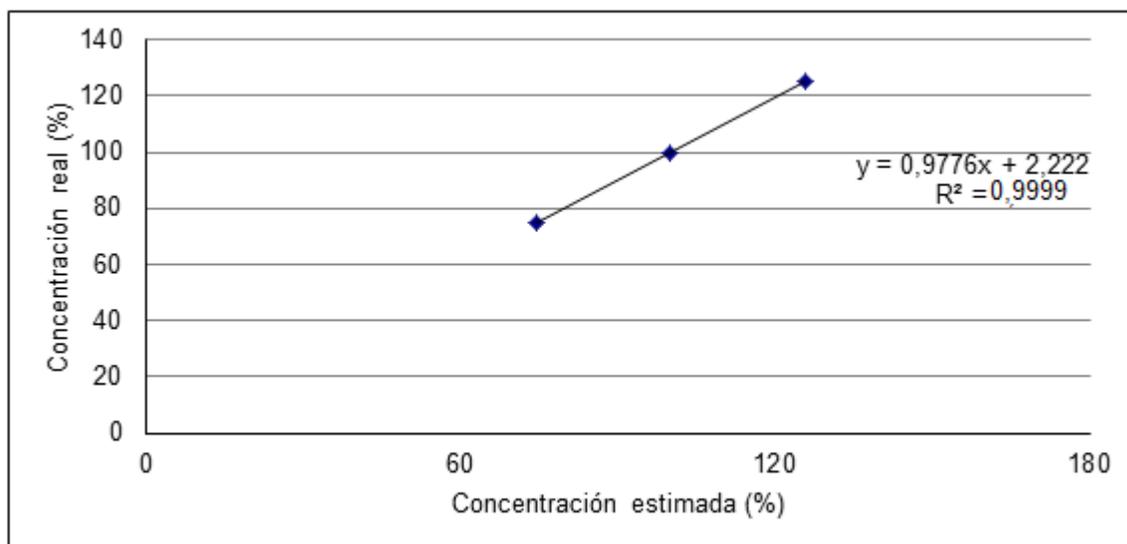
Los resultados presentados en porcentaje de recuperación tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicósido se encuentran dentro de los límites del criterio de aceptabilidad comprendido entre 98,0 % a 102,0 % promedio para cada nivel, según lo establecido en la ICH <sup>17</sup> y un coeficiente de variación menor al 2,0%.

Evaluando la linealidad entre los niveles de concentración estimados y reales para el Ibuprofeno y el Tiocolchicósido mediante representaciones gráficas en la gráfica 7 y 8 respectivamente. Donde se muestra que los coeficientes de determinación son cercanos a la unidad, es decir  $> 0,95$ <sup>27</sup>. Por lo tanto, indica que los niveles de concentraciones estimadas y reales son iguales.

**Gráfico 9.** Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Ibuprofeno.



**Gráfico 10.** Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Tiocolchicósido.



#### VI.4.5. 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 <sup>16</sup>. 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). Los parámetros se presentan en la tabla XXXI.

**Tabla XXXI.** Parámetros en la evaluación de la robustez.

Variable		Valor utilizados en el método	Nivel inferior	Nivel superior
A	pH	8,0	7,9	8,1
B	% Metanol	10	8	12
C	Flujo (mL/min)	1,3	1,2	1,4

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. En la tabla XXXII se muestra la matriz de Plackett y Burman utilizada.

**Tabla XXXII.** Matriz de Plackett y Burman utilizada.

Experimento	pH $\pm 0,1$	% Metanol $\pm 2$	Flujo de la fase móvil $\pm 0,2$ (mL/min)
1	7,9	8	1,2
2	8,1	8	1,2
3	7,9	12	1,2
4	8,1	12	1,2
5	7,9	8	1,4
6	8,1	8	1,4
7	7,9	12	1,4
8	8,1	12	1,4

Se realizó un patrón combinado de Ibuprofeno y Tiocolchicósido de concentración de 6,065 mg/mL y 0,04144 mg/mL respectivamente y una muestra realizada pesando 223,6 mg de material de referencia interno y siguiendo el procedimiento de tratamiento del material de referencia interno. El patrón y la muestra fueron inyectados por triplicado en cada experimento. Los resultados se muestran en el apéndice D, tabla 1 y 2 para el Ibuprofeno y Tiocolchicósido respectivamente.

**Tabla XXXIII.** Interpretación de los resultados de la robustez. Ibuprofeno.

s $\sqrt{2}$	10,1	
	Influencia	Resultado
A	3,0	CONFORME
B	-1,3	CONFORME
C	1,7	CONFORME
AB	3,2	CONFORME
AC	-2,3	CONFORME
BC	0,1	CONFORME
ABC	-5,2	CONFORME

**Tabla XXXIV.** Interpretación de los resultados de la robustez. Tiocolchicósido.

s $\sqrt{2}$	9,9	
	Influencia	Resultado
A	-3,3	CONFORME
B	1,0	CONFORME
C	1,0	CONFORME
AB	1,4	CONFORME
AC	-1,1	CONFORME
BC	-6,1	CONFORME
ABC	0,6	CONFORME

Los datos presentados en la tabla XXXIII y tabla XXXIV permiten confirmar si la variable tiene influencia significativa sobre el resultado, esto se hace comparando la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de  $s$  por raíz cuadrada de 2 <sup>12</sup>.

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

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), resultado que establece que el método es capaz de soportar diferentes alteraciones experimentales sin afectar la determinación del contenido, tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicósido.

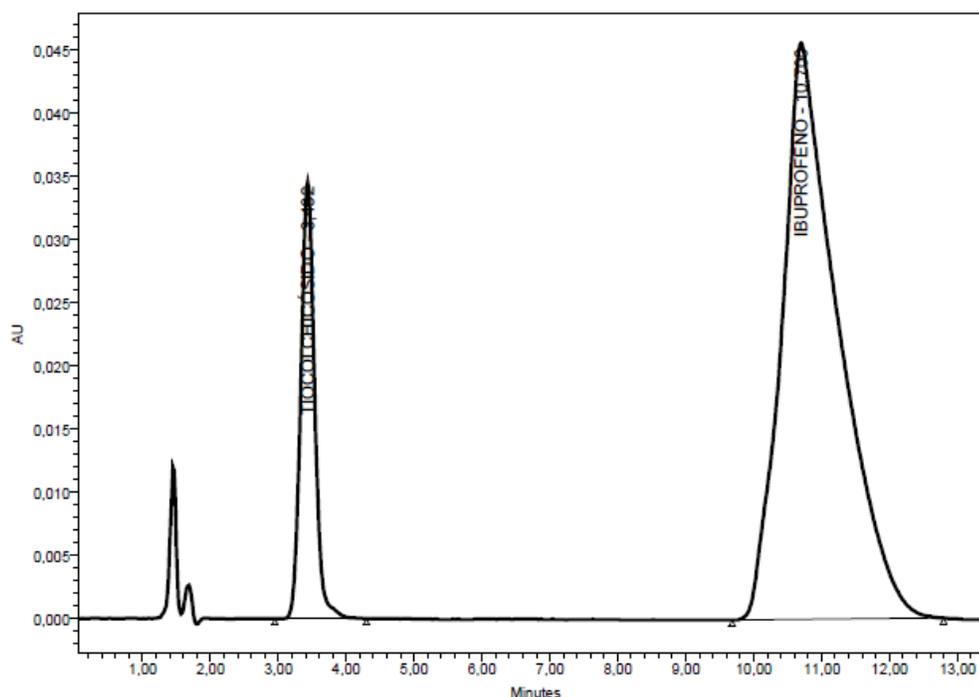
#### **VI.5. Determinación del contenido de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en medicamentos de diferentes marcas comerciales.**

Una vez desarrollado y validado el método analítico por HPLC, se procedió a determinar la cantidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en 4 medicamentos de diferentes marcas comerciales, 3 de ellos vigente para el momento del análisis (medicamentos A, C y D) y 1 de esos medicamentos vencido (medicamento B).

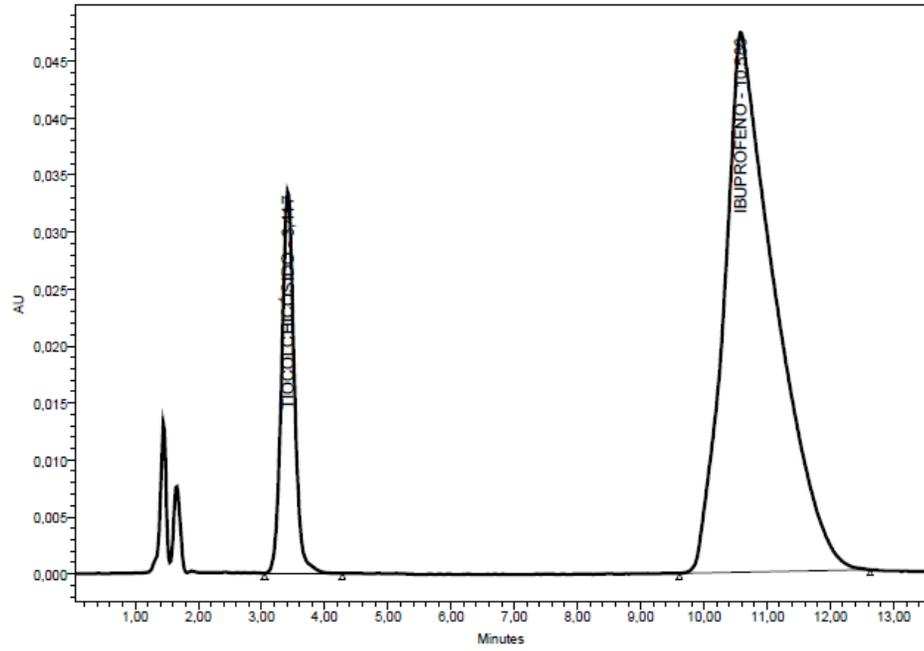
Los medicamentos A y B son de la misma marca comercial, pero diferentes lotes y fecha de vencimiento, el medicamento A estaba vigente y el medicamento B vencido para el momento del análisis, el medicamento vencido se analizó a fin de evaluar si el método es capaz de demostrar la composición del medicamento una vez vencido.

Para el análisis de los medicamentos se pesaron y pulverizaron 3 tabletas de cada medicamento por separado y se pesó alrededor de 1/4 de peso promedio de tabletas y se procedió a realizar el tratamiento de las muestras según la metodología propuesta. Se prepararon 3 réplicas para cada medicamento.

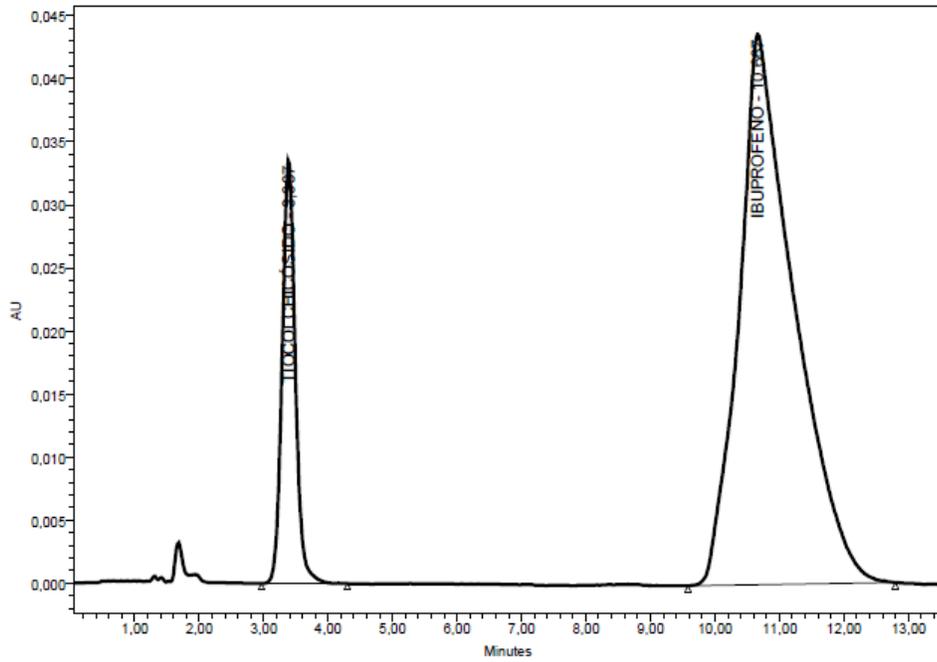
A continuación se presentan los cromatogramas correspondiente a la cuantificación de Ibuprofeno y Tiocolchicósido presente en las muestras de diferentes marcas comerciales.



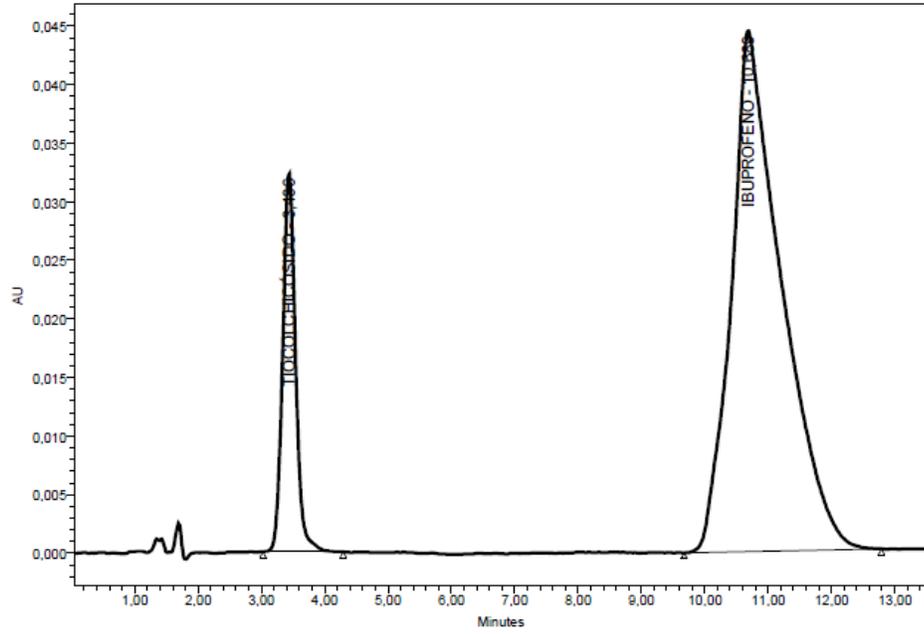
**Figura XXVIII.** Cromatograma correspondiente al medicamento A.



**Figura XXIX.** Cromatograma correspondiente al medicamento B.



**Figura XXX.** Cromatograma correspondiente al medicamento C.



**Figura XXXI.** Cromatograma correspondiente al medicamento D.

**Tabla XXXV.** Determinación del contenido de Ibuprofeno en medicamentos de diferentes marcas comerciales.

Medicamento	Réplica de muestra	Concentración (mg/tab)	% de lo declarado	Promedio (%)	CV (%)
A	1	602,62	100,6	100,2	1,0
		604,03			
	2	599,74	100,8		
		610,23			
	3	590,24	99,1		
		598,55			
B	1	562,74	93,9	93,3	0,8
		564,24			
	2	557,81	93,5		
		563,60			
	3	553,52	92,4		
		555,22			
C	1	564,55	94,2	93,1	1,7
		565,85			
	2	563,96	93,9		
		563,02			
	3	550,62	91,3		
		544,55			
D	1	623,87	103,1	103,8	0,9
		613,24			
	2	629,09	104,9		
	3	605,56	103,4		
		635,59			

**Tabla XXXVI.** Determinación del contenido de Tiocolchicósido en medicamentos de diferentes marcas comerciales.

Medicamento	Réplica de muestra	Concentración (mg/tab)	% de lo declarado	Promedio (%)	CV (%)
A	1	4,08	101,8	100,8	1,1
		4,06			
	2	4,03	100,9		
		4,04			
	3	3,98	99,6		
		3,99			
B	1	3,67	92,6	90,7	1,9
		3,74			
	2	3,62	89,8		
		3,56			
	3	3,57	89,6		
		3,60			
C	1	4,01	100,4	99,2	1,9
		4,02			
	2	4,01	100,3		
		4,01			
	3	3,90	97,0		
		3,86			
D	1	4,12	102,4	104,5	1,8
		4,07			
	2	4,24	106,0		
	3	4,22	105,1		
		4,19			

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 <sup>16</sup>. Por lo que todos los medicamentos cumplen

este criterio de aceptación y también cumple con un coeficiente de variación menor al 2%.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que el medicamento B se encuentra entre los límites de aceptación, pero está por debajo con respecto al medicamento A. 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

Estos resultados 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.

## VII. CONCLUSIONES.

- Se desarrolló un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas. Se utilizó como condiciones cromatográficas una columna Hamilton PRP-1 (5 $\mu$ m, 4,1 x 150 mm), a temperatura ambiente y de forma isocrática, con una fase móvil constituida por Metanol: Acetonitrilo: Agua en composición (10:20:70) % v/v y 0,05 % Trietilamina, a pH de 8,0  $\pm$  0,1 ajustado con ácido ortofosfórico al 85 %, un flujo de fase móvil de 1,3 mL/min, un volumen de inyección de 5  $\mu$ L y la longitud de onda de 260 nm.
- Se validó el método analítico desarrollado de acuerdo con la categoría I del apartado <1225> de la USP 38 NF 33.
- Se obtuvo que el método analítico desarrollado es lineal en el rango de los 5 niveles de concentración, tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicósido, con coeficientes de correlación mayores o iguales a 0,999. En un rango de concentración de 3,0 mg/mL a 9,0 mg/mL para el Ibuprofeno y 0,02 mg/mL a 0,06 mg/mL para el Tiocolchicósido.
- Se evaluó la linealidad interdiaria demostrando poca variabilidad en la sensibilidad del método, tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicósido.
- El método desarrollado fue preciso, ya que los coeficientes de variación obtenidos para la precisión del sistema son menores al 2 %, tanto en los tiempos de retención, como en las áreas de los picos. Al evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia también se obtuvieron coeficientes de variación menores al 2 %. Esto se comprobó en los dos principios activos.

- La muestra fue sometida a degradación artificial obteniéndose, que en presencia de peróxido de hidrógeno al 35% en exposición de 3 días, la muestra sufre degradación tanto para el Ibuprofeno como para el Tiocolchicósido. En cambio, en presencia de hidrólisis ácida, hidrólisis básica, termólisis y fotólisis, ninguno de los dos principios activos producen degradado, es por esto que se puede decir que el método es selectivo, ya que es capaz de separar, identificar y cuantificar Ibuprofeno y Tiocolchicósido de forma inequívoca.
- El método analítico desarrollado resultó ser exacto, ya que se encontraron porcentajes de recuperación dentro de los criterios de aceptación siendo de 98 – 102 %, para los niveles de concentración de 75 %, 100 %, 125 % para ambos principios activos.
- El método desarrollado fue robusto para el análisis simultáneo de Ibuprofeno y Tiocolchicósido bajo las condiciones de,  $\text{pH} = 8,0 \pm 0,1$ ; flujo de la fase móvil =  $1,3 \pm 0,1$  mL/min y un porcentaje de metanol en la fase móvil =  $10,0 \pm 0,2$  %.
- Se analizaron medicamentos de diferentes marcas comerciales, que declaraban tener 600 mg de Ibuprofeno y 4 mg de Tiocolchicósido y se encontró que para los cuatro medicamentos se cumplió con los criterios de aceptación, que se encuentra entre el 90 – 110 % respecto a la cantidad declarada.
- Los resultados obtenidos para el análisis de un medicamento vencido 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, ya que la fecha de vencimiento está indicando hasta cuándo son estables los medicamentos.

- El método desarrollado y validado puede ser empleado como indicador de estabilidad, ya que permite visualizar la presencia de productos degradados y cuantificar los principios activos luego de someter a las muestras a pruebas de estrés o degradación forzada.
- El método analítico desarrollado para el análisis simultáneo de Ibuprofeno y Tiocolchicósido en tabletas resulto ser, selectivo, preciso, exacto, robusto y lineal en el rango de concentración establecido.
- El método desarrollado y validado puede ser empleado en análisis de rutina y control de calidad de Ibuprofeno y Tiocolchicósido combinados en tabletas, ya que proporciona resultados confiables y cumple con las especificaciones establecidas en los parámetros de validación.

## VIII. RECOMENDACIONES.

- Evaluar la robustez del método desarrollado pero en este caso, variando la longitud de onda de trabajo, utilizando otra columna y variando la concentración del otro solvente orgánico utilizado, que en este caso es el acetonitrilo.
- Desarrollar y validar un método analítico para el ensayo de disolución de Ibuprofeno y Tiocolchicósido combinados en tabletas. Esta prueba complementaria satisfactoriamente la metodología propuesta ya que no basta con que un medicamento cumpla con las cantidades declaradas en la formulación, es necesario garantizar que el medicamento se liberará adecuadamente en el organismo para así poder llegar al lugar de acción.
- No consumir medicamentos luego de su fecha de vencimiento, aunque su concentración se encuentre dentro de los criterios de aceptación, no se recomienda hacerlo, 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.

## IX. BIBLIOGRAFÍA.

- <sup>1</sup> R. Godoy. Monografía Tiocolchicósido. Dirección médica de Laboratorios Galeno. Venezuela (2012) 9, 10, 11 y 12.
- <sup>2</sup> S. Gómez, J. Martínez, F. Martínez. Validación de un método analítico empleando cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación de ibuprofeno en medios biorrelevantes. Universidad Nacional de Colombia (2010).
- <sup>3</sup> A. Umkar, S. Bavaskar, P. Yewale. Thiocolchicoside as muscle relaxant: a review. International Journal of Pharmacy and Biological Science (2011) 364, 365.
- <sup>4</sup> J. García. Ibuprofeno, revisión fármacoterapeuta. Revista puesta al día. Uruguay (2007). [En línea]. Consultado en Enero del 2016 Disponible en: [http://tendenciasenmedicina.com/Imagenes/imagenes02p/art\\_10.pdf](http://tendenciasenmedicina.com/Imagenes/imagenes02p/art_10.pdf)
- <sup>5</sup> V. Hall, N. Murillo, M. Rocha, E. Rodríguez. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE'S). Universidad de Costa Rica (2001) 3,10.
- <sup>6</sup> S. Santibañez. Determinación de la cinética de degradación de diclofenaco, ibuprofeno y su mezcla, a temperatura ambiente. Universidad Autónoma del Estado de México (2014) 21,22.
- <sup>7</sup> Ibuprofeno. [En línea]. Consultado en Diciembre del 2015 Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Ibuprofeno.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Ibuprofeno.htm)
- <sup>8</sup> S. Matkovic, G. Valle, M. Galle, L. Briand. Desarrollo y Validación del Análisis Cuantitativo de Ibuprofeno en Comprimidos por Espectroscopía Infrarroja. Universidad Nacional de La Plata, Argentina (2004)
- <sup>9</sup> P. Akshay, R, Govind, S. Raju, J. Dev. A Study on Fixed Dose Combination Tablets of Cytokine Inhibitor and Thiocolchicoside. Universidad Bhagwant de la India (2013) 44.

- <sup>10</sup> Tiocolchicósido [En línea]. Consultado en Febrero del 2016 Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/compound/inspect/CHEMBL1705373>
- <sup>11</sup> Tiocolchicósido [En línea]. Consultado en Diciembre del 2015 Disponible en: <http://ve.privademecum.com/droga.php?droga=1420>
- <sup>12</sup> O. Quattrocchi, S. Abelaira, R. Laba. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Buenos Aires (1992).
- <sup>13</sup> Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). <621> USP 38 NF 33. Estados Unidos (2015).
- <sup>14</sup> D. Skoog, F. James, S. Crouch. Principios de análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning Editores. México (2008) 762,816-817, 828-848.
- <sup>15</sup> D. Skoog, F. James, S. Crouch. Principios de análisis instrumental. Quinta edición. Cengage Learning Editores. México (2001) 808-810.
- <sup>16</sup> Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). <1225> USP 38 NF 33. Estados Unidos (2015).
- <sup>17</sup> International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). [Monografía en Internet]. 4ª Ed. Ginebra: ICH; 2005. [En línea]. Consultado el 28 de Febrero de 2016. Disponible en: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- <sup>18</sup> Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). USP 38 NF 33 Ibuprofeno. Estados Unidos (2015).
- <sup>19</sup> S. Pattanaik, S. Mukhi, G. Pattnaik, J. Panda. Assay method development and validation of ibuprofen tablets by HPLC. India (2013).

- <sup>20</sup> P. Reddy, MS Reddy. RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Ibuprofen in Tablets. India y Estados Unidos (2009).
- <sup>21</sup> L. Peikova, M. Georgieva, B. Tsvetkova. RP-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and famotidine in pharmaceutical dosage form. Bulgaria (2014).
- <sup>22</sup> D. Chandni, H. Chorawala, Z. Dedania, S. Vijendraswamy. Development and Validation of Normal Phase HPLC Method for Estimation of Thiocolchicoside in Capsule Dosage Formulation. India (2015).
- <sup>23</sup> M. Harde, D. Dharam, S. Jadhav, A. Balap. Development And Validation Of RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation Of Thiocolchicoside And Dexketoprofen In Bulk And Tablet Dosage Form. India (2012).
- <sup>24</sup> S. Kumar, A. Joshi, R. Singh, A. pathak, K. shah. Simultaneous estimation of etoricoxib and thiocolchicoside by RP-HPLC method in combined dosage forms. India (2011).
- <sup>25</sup> A. Dhiware, S. Gandhi, P. Deshpande, V. Bhavnani. A simple and sensitive RP-HPLC method for simultaneous estimation of etodolac and thiocolchicoside in combined tablet dosage form. India (2012).
- <sup>26</sup> Icon Argentina. [En línea]. Consultado en Agosto del 2016 Disponible en: [http://www.icon-sa.com/columnas\\_hplc\\_polimericas\\_hamilton%20PRP.htm](http://www.icon-sa.com/columnas_hplc_polimericas_hamilton%20PRP.htm)
- <sup>27</sup> Aguirre L, García F, García T, Illera M, Juncadilla M, Lizondo M, et al. 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, 2001.

- <sup>28</sup> Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). <3> USP 38 NF 33. Estados Unidos (2015).
- <sup>29</sup> Universidad Rafael Landívar. Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina A en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en guayaba fresa. [En línea]. Guatemala. México. Consultado en Agosto del 2016. Disponible en: <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/02/02/Arias-Luisa.pdf>
- <sup>30</sup> Universidad Central de Venezuela. Guía de estudios de Química Analítica II. Venezuela. 2013. Pág. 28, 29.
- <sup>31</sup> Naturvida, Contenidos Digitales 2008-2016. [En línea]. Consultado en Agosto del 2016 Disponible en: <http://www.natursan.net>
- <sup>32</sup> Definicion.de, Copyright © 2008-2016. [En línea]. Consultado en Agosto del 2016 Disponible en: <http://definicion.de>
- <sup>33</sup> Salud.ccm [En línea]. Consultado en Agosto del 2016 Disponible en: <http://salud.ccm.net/faq/6020-liquido-sinovial-puncion-articular>
- <sup>34</sup> Concepto de definición [En línea]. Consultado en Agosto del 2016 Disponible en: <http://conceptodefinicion.de/fisiopatologia/>
- <sup>35</sup> Wordre ference [En línea]. Consultado en Agosto del 2016 Disponible en: <http://www.wordreference.com/definicion/semisint%C3%A9tico>
- <sup>36</sup> Glosario de términos farmacológicos [En línea]. Consultado en Agosto del 2016 Disponible en: <http://glosario.sld.cu/terminos-farmacologicos/2011/05/03/tiempo-de-vida-media/>

## Apéndice.

### Apéndice A. Figuras de méritos.

Numero de inyecciones	Tr (minutos)		Área		Rs	As	
	TIO	IBU	TIO	IBU		TIO	IBU
1	3,145	9,70	360296	1788893	5,33	1,17	1,15
2	3,142	9,69	359855	1790694	5,33	1,17	1,19
3	3,136	9,65	370106	1829951	5,24	1,14	1,19
4	3,135	9,64	371024	1835227	5,18	1,14	1,19
5	3,139	9,66	371355	1837710	5,39	1,17	1,15
Promedio	3,140	9,67	366527	1816495	5,29	1,16	1,18
Desviación estándar	0,004	0,03	5909	245434	0,09	0,02	0,02
Coficiente de variación	0,130	0,26	1,6	1,4	1,64	1,42	1,77

## Apéndice B. Linealidad. Curva de calibración.

**Tabla 1.** Curva de calibración. Linealidad día 1. Ibuprofeno

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
1	50	3,004	881477
1	50	3,004	886412
2	75	4,505	1301498
2	75	4,505	1332647
3	100	6,007	1736040
3	100	6,007	1753931
3	100	6,007	1780010
3	100	6,007	1778885
3	100	6,007	1790943
4	125	7,509	2209896
4	125	7,509	2199549
5	150	9,011	2632381
5	150	9,011	2636249

**Tabla 2.** Curva de calibración. Linealidad día 2. Ibuprofeno

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
1	50	3,007	907906
1	50	3,007	915028
2	75	4,511	1359545
3	100	6,015	1848362
3	100	6,015	1840799
3	100	6,015	1823509
3	100	6,015	1879966
3	100	6,015	1853979
4	125	7,518	2315139
4	125	7,518	2279991
5	150	9,022	2722875

**Tabla 3.** Curva de calibración. Linealidad día 3. Ibuprofeno

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
1	50	3	901568
1	50	3	890460
2	75	4,5	1296180
2	75	4,5	1305978
3	100	6	1762429
3	100	6	1795920
3	100	6	1773139
3	100	6	1821577
3	100	6	1790914
4	125	7,501	2200347
4	125	7,501	2232268
5	150	9,001	2661527
5	150	9,001	2643038

**Tabla 4.** Curva de calibración. Linealidad día 1. Tiocolchicosido.

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
1	50	0,023	183076
1	50	0,023	183917
2	75	0,034	273449
2	75	0,034	276965
3	100	0,046	361440
3	100	0,046	363204
3	100	0,046	367552
3	100	0,046	368378
3	100	0,046	370186
4	125	0,057	463644
4	125	0,057	457035
5	150	0,069	559632
5	150	0,069	557159

**Tabla 5.** Curva de calibración. Linealidad día 2. Tiocolchicósido.

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
1	50	0,023	189305
1	50	0,023	185736
2	75	0,034	282691
3	100	0,045	377022
3	100	0,045	375213
3	100	0,045	371308
3	100	0,045	377587
3	100	0,045	376881
4	125	0,056	474054
4	125	0,056	468101
5	150	0,068	574860

**Tabla 6.** Curva de calibración. Linealidad día 3. Tiocolchicósido.

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
1	50	0,023	185912
1	50	0,023	182804
2	75	0,034	267011
2	75	0,034	271901
3	100	0,045	359146
3	100	0,045	369602
3	100	0,045	364485
3	100	0,045	375176
3	100	0,045	371942
4	125	0,057	468829
4	125	0,057	467855
5	150	0,068	560805
5	150	0,068	549417

### Apéndice C. Linealidad. Criterios de aceptación.

**Tabla 1.** Criterios de aceptación para la linealidad del Ibuprofeno. Día 1.

Promedio de áreas	Concentración (mg/mL)	Factor de respuesta
883944,3	3,004	294256
1317072,054	4,505	292358
1767961,576	6,007	294317
2204722,151	7,509	293611
2634314,915	9,011	292344
	Promedio	293377
	Desviación estándar	977
	% CVf	0,3

**Tabla 2.** Criterios de aceptación para la linealidad del Ibuprofeno. Día 2.

Promedio de áreas	Concentración (mg/mL)	Factor de respuesta
911467,301	3,007	303115
1359549,583	4,511	301385
1849322,963	6,015	307452
2297565,124	7,518	305609
2722874,468	9,022	301804
	Promedio	303873
	Desviación estándar	2592
	% CVf	0,9

**Tabla 3.** Criterios de aceptación para la linealidad del Ibuprofeno. Día 3.

Promedio de áreas	Concentración (mg/mL)	Factor de respuesta
896013,673	3	298671
1301079,15	4,5	289129
1788795,812	6	298133
2216307,137	7,501	295468
2652282,08	9,001	294665
	Promedio	295213
	Desviación estándar	3804
	% CVf	1,3

**Tabla 4.** Criterios de aceptación para la linealidad del Tiocolchicósido. Día 1.

Promedio de áreas	Concentración (mg/mL)	Factor de respuesta
183496,2835	0,023	7978099
275206,521	0,034	8094309
366152,056	0,046	7959827
460339,2395	0,057	8076127
558395,834	0,069	8092693
	Promedio	8040211
	Desviación estándar	65747
	% CVf	0,8

**Tabla 5.** Criterios de aceptación para la linealidad del Tiocolchicósido. Día 2.

Promedio de áreas	Concentración (mg/mL)	Factor de respuesta
187520,044	0,023	8153045
282690,816	0,034	8314436
375602,2458	0,045	8346717
471077,1985	0,056	8412093
574859,944	0,068	8453823
	Promedio	8336023
	Desviación estándar	115893
	% CVf	1,4

**Tabla 6.** Criterios de aceptación para la linealidad del Tiocolchicósido. Día 3.

Promedio de áreas	Concentración (mg/mL)	Factor de respuesta
184357,946	0,023	8015563
269456,0965	0,034	7925179
368070,0706	0,045	8179335
468341,4895	0,057	8216517
555111,2705	0,068	8163401
	Promedio	8099999
	Desviación estándar	124079
	% CVf	1,5

### Apéndice D. Robustez.

**Tabla 1.** Evaluación de la robustez. Ibuprofeno.

Experimento	Replica			Promedio de área	% CV	Concentración mg/tab	Porcentaje de lo declarado (%)
	1	2	3				
1	2132648,40	2108506,62	2117443,95	2119533	0,6	607,0	101,0
2	2058182,59	2056897,84	2068124,88	2061068	0,3	588,0	98,0
3	2248885,72	2205778,23	2178239,92	2210968	1,6	548,0	91,0
4	2366245,51	2366098,78	2380233,55	2370859	0,3	630,0	105,0
5	1723667,08	1743909,00	1761681,50	1743086	1,1	599,0	100,0
6	1858218,68	1884086,62	1876859,73	1873055	0,7	615,0	103,0
7	1691291,48	1707664,38	1742905,52	1713954	1,5	604,0	101,0
8	1806762,82	1824322,42	1828831,12	1819972	0,6	597,0	99,0
					Promedio	598,0	100,0
					Desviación estándar	24,0	4,0
					% CV	4,0	4,0
					$s*\sqrt{2}$		10,1

**Tabla 2.** Evaluación de la robustez. Tiocolchicósido.

Experimento	Replica			Promedio de área	% CV	Concentración mg/tab	Porcentaje de lo declarado (%)
	1	2	3				
1	399298,20	403445,57	398793,81	400513	0,6	3,9	98,0
2	388373,96	390213,20	386377,90	388322	0,5	3,8	95,0
3	490224,98	489808,60	491151,13	490395	0,1	4,2	104,0
4	450257,00	444236,29	446981,52	447158	0,7	4,1	103,0
5	364586,16	356593,81	356385,90	359189	1,3	4,3	107,0
6	351465,28	352140,58	351892,98	351833	0,1	4,0	101,0
7	319554,88	320165,16	323858,19	321193	0,7	4,0	100,0
8	340363,69	348158,63	343905,76	344143	1,1	3,9	97,0
Promedio						4,0	101,0
Desviación estándar						0,1	4,0
% CV						3,9	34,0
$s*\sqrt{2}$							9,9

**Apéndice E.** Ecuaciones para el cálculo de las figuras de mérito del sistema cromatográfico.

**Factor de retención:**  $K' = \frac{T_R - T_M}{T_M}$ , siendo  $T_R$ : tiempo de retención del analito,  $T_M$ : tiempo muerto.

**Factor de resolución:**  $R = \frac{2(T_2 - T_1)}{W_2 + W_1}$ , siendo  $W$ : ancho del pico cromatográfico.

**Factor de asimetría:**  $As = \frac{W_{0,05}}{2f}$ , siendo  $W_{0,05}$ : ancho del pico cromatográfico al 5% de la altura,  $f$ : es la distancia entre el borde simétrico del pico y el centro del mismo medida al 5 % de la altura del pico de la línea base.

## **Glosario de términos.**

**Analgésico.** Es un medicamento cuya función principal es la de calmar, aliviar o eliminar el dolor. Entre otros aspectos, ayuda a reducir o aliviar los dolores de cabeza, musculares, de origen artrítico y otros dolores o ataques relacionados. Existen diferentes tipos de analgésicos, entre los que podemos destacar los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos, los analgésicos opiáceos mayores y otros fármacos adyuvantes <sup>31</sup>.

**Antiinflamatorio.** Son medicamentos que se utilizan para prevenir o disminuir la inflamación de los tejidos. El mecanismo mediante el cual actúan es el de impedir –o inhibir- la biosíntesis de sus agentes mediadores, conocidos como eicosanoides o derivados del ácido araquidónico. Fundamentalmente existen dos grandes grupos de fármacos o medicamentos antiinflamatorios: los esteroides y los no esteroides <sup>31</sup>.

**Antipirético.** Es un medicamento que permite combatir la fiebre. Esta clase de sustancia también recibe el nombre de antifebril o antitérmico <sup>32</sup>.

**Espacios sinoviales.** Están constituidos por el líquido sinovial o sinovia que es un líquido producido por la membrana sinovial (membrana que cubre el interior de la cápsula de las articulaciones). Este líquido viscoso, transparente o amarillo claro, desempeña un papel de lubricante en la articulación y proporciona nutrición al cartílago <sup>33</sup>.

**Fisiopatología.** Es una de las disciplinas más elementales de los estudios médicos generales. Consiste en los análisis y observaciones que se le realizan al ser vivo (no solo humanos y animales, también a la flora) desde el aspecto clínico. El término está compuesto por dos más, “Fisio” que significa “Cuerpo” y “Patología” que nos refiere a “Enfermedad”. En la fisiopatología no solo se estudia el cuerpo de las especies para determinar las clases de enfermedades o para determinar la fisonomía de los órganos, también se hace para captar las diferentes morfologías y deformaciones del organismo así como también para observar el comportamiento de este frente a algún medicamento o tratamiento que se esté implementando <sup>34</sup>.

**Semisintético.** Se obtiene de elementos naturales mediante un proceso de síntesis química <sup>35</sup>.

**Tisular.** Es un adjetivo que se emplea en el ámbito de la biología para hacer referencia a aquello vinculado a un tejido. Cabe recordar que los tejidos son conjuntos de células que actúan de forma coordinada para desarrollar una cierta función <sup>32</sup>.

**Vida media plasmática.** Es el tiempo necesario para eliminar 50 % del fármaco del organismo. Tiempo que tarda la concentración plasmática del fármaco en reducirse a la mitad de sus niveles iniciales <sup>36</sup>.