

# Optimización y validación de una metodología analítica para la determinación de lisinato de ibuprofeno, como droga pura y en inyectables, utilizando cromatografía líquida de alta resolución

Barrandeguy, Julieta; Mantovani, Víctor E.; Robles, Juan C.

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, C.C. 242 (3000) Santa Fe, Argentina.

E-mail: barrande@fbc.unl.edu.ar

**RESUMEN:** Se desarrolló una metodología analítica común para cuantificar lisinato de ibuprofeno en droga pura y en inyectables, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), basada en el método propuesto por la USP XXIII para ibuprofeno droga pura. Se evaluaron parámetros de optimización del método: número de platos teóricos, factor de capacidad, asimetría de pico y desviación estándar relativa (RSD).

Se realizó su validación, determinando parámetros de performance analíticos como: linealidad, precisión y exactitud.

El método propuesto es sencillo, presenta linealidad en el rango de trabajo adoptado, es preciso y exacto. Permite resolver con un mismo sistema cromatográfico dos tipos de muestra diferentes, lo que lo hace apropiado para los controles rutinarios de calidad, ya sea de inyectables y/o droga pura.

**SUMMARY: OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHODOLOGY TO DETERMINATE IBUPROFEN LYSINATE IN PURE DRUGS AND INJECTIONS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.** Barrandeguy, Julieta; Mantovani, Víctor E.; Robles, Juan C. A common analytical methodology to determinate ibuprofen lysinate in pure drug and injections was developed by high-performance liquid chromatography based on the method suggested by the USP XXIII for ibuprofen drug.

Parameters of optimization were evaluated: number of theoretical plates, capacity factor, asymmetry of the peak and relative standard deviation (RSD).

Its validation was made by determining parameters of analytical performance such as: linearity, precision and accuracy.

This method is simple, showing linearity in the range of work selected. It is precise and accurate. Two different kinds of samples, injections and pure drugs, are allowed to be solved with the same chromatography system, making it suitable for routine quality control.

## Introducción

El lisinato de ibuprofeno a través de su principio activo es un antiinflamatorio no esteroide (AINE), del grupo de los inhibidores de la prostaglandina sintetasa (IPS), efectivo en el tratamiento sintomático de la artritis reumatoidea y osteoartritis (1,2). Se han reportado métodos para la cuantificación de ibuprofeno por espectrofotometría (3-7), en medicamentos y líquidos biológicos por HPLC y TLC (8 - 19), en plasma humano (20), en asociaciones con paracetamol y clorzoxazona por HPTLC (8), y métodos para determinar la composición enantiomérica de los profenos en general (21-26). En los métodos

citados no se menciona el lisinato de ibuprofeno. El método de cuantificación tanto de droga pura como de inyectables no figuran codificados en las farmacopeas más utilizadas para la evaluación de fármacos, como son la Británica (BP) y la Norteamericana (USPXXIII) (27,28).

Cabe destacar que el lisinato de ibuprofeno inyectable es comercializado en nuestro país por numerosos laboratorios productores de fármacos.

## Materiales y Métodos

### Equipos

Cromatógrafo líquido de alta resolución marca Hitachi-Merck con las siguientes características: integrador modelo D-7500, inyector y horno calefactor de columna (column oven) modelo L-7350, bomba modelo L-7100, detector modelo L-7400 U.V. de

Este trabajo fue parcialmente presentado en el "II Encuentro de Jóvenes Investigadores" - U.N.L.-FUL. 26 y 27 de agosto de 1998. Santa Fe y en las "VI Jornadas de Jóvenes Investigadores del Grupo Montevideo". 17 y 18 de setiembre de 1998. Santa Fe (Argentina).

longitud de onda variable.

Columna LiChroCART RP-18 (5 $\mu$ m) de 12.5 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno.

#### Reactivos

Agua: grado HPLC, 18-5. Em Science.

Acetonitrilo: grado HPLC, GC. Em Science.

Ácido cloro acético: grado analítico. Merck.

Hidróxido de amonio: grado analítico. Merck.

#### Condiciones cromatográficas

La fase móvil se preparó por disolución de 4.0 g de ácido cloroacético en 400 mL de agua ajustada a pH: 3.0 con hidróxido de amonio, a la que se le adicionó 600 mL de acetonitrilo (29). Se desgasificó y filtró con membranas de nylon de 0.45  $\mu$ m, 47 mm.

El flujo fue de 1 mL min<sup>-1</sup> y los volúmenes de las soluciones estándar y muestras inyectados fueron de 20  $\mu$ L cada uno (por triplicado). Se trabajó a temperatura ambiente, ajustando la longitud de onda de detección a 263 nm. La RSD para inyecciones repetidas no fue mayor al 1.0 %.

#### Soluciones estándares

Se prepararon cinco soluciones de concentración aproximadamente: 0.08, 0.20, 0.40, 0.60 y 0.80 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente, utilizando la fase móvil como disolvente. Se utilizó un estándar secundario de lisinato de ibuprofeno de 99.6 % de pureza en base anhidra. Con estas soluciones se realizó la curva de calibrado haciendo tres inyecciones con cada estándar.

#### Solución de muestra de droga pura

Se preparó una solución de concentración comprendida entre 0.20 y 0.60 mg mL<sup>-1</sup>, utilizando la fase móvil como disolvente.

#### Solución de muestra inyectable

Se utilizó una preparación comercial de la si-

guiente composición declarada:

Ibuprofeno lisinato: 400 mg

Lidocaina clorhidrato: 0.03 g

Agua para inyectable: csp 3.00 mL

Se hizo un pool de veinte inyectables y se tomó un volumen exactamente medido del mismo de manera de obtener una solución de concentración comprendida entre 0.20 y 0.60 mg mL<sup>-1</sup>, llevando a 10.00 mL con la fase móvil. Las muestras se desgasificaron y filtraron con membranas de nylon de 0.45  $\mu$ m, y 3 mm de diámetro.

#### Resultados y Discusión

Para cuantificar ibuprofeno como droga pura, la USP XXIII (29), utiliza una columna de igual tipo de empaque pero de mayor longitud (4.6 mm x 25 cm), una velocidad de flujo de 2.0 mL min<sup>-1</sup>, valerofenona como estándar interno e indica inyectar 5  $\mu$ L de solución estándar de 12 mg mL<sup>-1</sup>; requiere que la RSD para inyecciones repetidas no sea mayor a 2.0 % y que la resolución entre el pico del analito y el del estándar interno no sea menor a 2.5. La longitud de onda de lectura es 254 nm.

Por no disponer de la columna requerida por USP XXIII y debido a la imposibilidad de contar con valerofenona como estándar interno, se desarrolló el método utilizando una columna de menores dimensiones, sin emplear estándar interno lo cual se justificó al evaluar las RSD de las diferentes soluciones analizadas, que resultaron menores al 1%. Se emplearon soluciones más diluidas del estándar y de las muestras analizadas debido a que se obtuvieron picos con mejor resolución. La longitud de onda utilizada fue de 263 nm correspondiente al máximo de absorción del compuesto disuelto en la fase móvil.

#### Optimización del método

Se evaluaron la eficiencia, el factor de capacidad, la asimetría de pico y la RSD (30), utilizando las soluciones estándar de lisinato de ibuprofeno, resultado del promedio de 15 datos. Los parámetros de optimización se muestran en tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de optimización

Eficiencia platos teóricos	Factor de capacidad (k')	Asimetría de pico	RSD
20880/m	4.17	1.00	0.58 valor máximo

**Validación del método**

Se determinaron parámetros de performance analíticos como: linealidad, precisión y exactitud (31,32).

*Linealidad*

Se realizó una curva de calibrado con cinco soluciones de diferentes concentraciones de lisinato de ibuprofeno estándar, como se indica en la tabla 2. Las inyecciones se efectuaron por triplicado.

**Tabla 2.** Soluciones estándar de lisinato de ibuprofeno

Soluciones de lisinato de ibuprofeno estándar	Concentración mg mL <sup>-1</sup>	µg	RSD
Solución 1	0.0810	1.62	0.31
Solución 2	0.2430	4.86	0.32
Solución 3	0.4050	8.10	0.58
Solución 4	0.6480	12.96	0.52
Solución 5	0.8100	16.20	0.34

La curva de calibrado resultó lineal en el rango de trabajo examinado, con un coeficiente de correlación de 0.99989.

*Precisión*

Se determinó la RSD, para las inyecciones de

cada una de las soluciones estándares utilizadas en la construcción de la curva de calibrado. Tabla 2.

Los inyectables, se analizaron durante tres días diferentes, con igual preparación de la muestra y haciendo inyecciones por triplicado. Se obtuvieron además de los valores de RSD % para cada día, la media y el límite de confianza. Tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros estadísticos obtenidos para inyectables

Muestra	Concentración Lisinato ibuprofeno $\bar{x}$ (mg/3ml)	Límite de confianza *	RSD
Inyectable día 1	413.0	412.3 - 413.7	0.41
Inyectable día 2	397.3	396.7 - 397.9	0.06
Inyectable día 3	403.7	403.7 - 404.6	0.19

$$* \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} = (\alpha=0.05)$$

*Exactitud*

Se realizaron ensayos de recuperación sobre soluciones de droga pura e inyectables, agregando incrementos de lisinato de ibuprofeno a partir de una solución estándar, obteniéndose los siguientes resultados:

Recuperación sobre inyectables = 99.7 % RSD = 0.29 %.  
Recuperación sobre droga pura = 101.2 % RSD = 0.19 %.

*Límites de Detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ)*

No fueron necesarias las evaluaciones de LOD y LOQ debido a que el ingrediente activo a ser me-

dido se encuentra como componente principal (31,32).

## Conclusiones

El método propuesto presenta parámetros de optimización satisfactorios, linealidad en el rango de trabajo adoptado, buen nivel de recuperación y de precisión.

Permite resolver con un mismo sistema cromatográfico dos tipos de muestras, lo que lo hace apropiado para los controles rutinarios de calidad, ya sea en inyectables y/o droga pura. La preparación de las muestras es sencilla y los tiempos de análisis son cortos.

## Agradecimientos

A Laboratorios Federales Argentinos S.A. por ceder el instrumental y facilitar la realización de una parte de este trabajo, en el marco del convenio de transferencia que tiene dicha empresa con el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Julieta Barrandeguy agradece a la Universidad Nacional del Litoral por su Beca de Perfeccionamiento.

## Bibliografía

- 1- Smith, C.M. 1993. "Farmacología". Editorial Médica Panamericana (Buenos Aires) 410.
- 2- Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; Goodman Gilman, A. 1996. "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Mc Graw-Hill Interamericana Editores. S.A. (México) I. 686.
- 3- Singhvi I., Chaturvedi S. C., 1998. Spectrophotometric methods for simultaneous determination of ibuprofen and pseudoephedrine hydrochloride from tablets. *Indian Drugs*, **35**, 4: 234-238.
- 4- Babu, M. N., 1998. Spectrophotometric method for the determination of ibuprofen using safranin. *Indian Drugs*, **35**, 1: 32-33.
- 5- El Kousy, Naglaa, M., 1995. Spectrophotometric methods for the determination of ibuprofen and its degradation product 4-isobutylacetophenona. *Bull. Fac. Pharm.*, **33**, 3: 79-84.
- 6- El Ragehy N. A., Abdelkawy M., El Bayoumy A., 1994. Spectrophotometric determination of ibuprofen via its copper(II) complex. *Anal. Lett.*, **27**, 11: 2127-2139.
- 7- Singhai A. K., Khapra P., Jain N.K., 1991. Colorimetric determination of ibuprofen in the presence of pharmaceutical dosage forms. *J. Inst. Chem.* **63**, 2: 71.
- 8- Sodhi R. A., Chawla J. L., Sane R. T. 1996. Simultaneous determination of paracetamol, ibuprofen and chlorzoxazone by HPLC, HTPLC and GC methods. *Indian Drugs*, **33**, 6: 280-285.
- 9- Zarakar S. S., Kolte S. S., Dhanvate A. A., Shivalkar S. A., 1996. High-performance liquid chromatographic determination of chlorzoxazone and ibuprofen, simultaneously from pharmaceutical preparations. *Indian Drugs*, **33**, 6: 275-279.
- 10- Brushan R., Parshad V., 1996. Resolution of (+/-) ibuprofen using L-arginine-impregnated thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, **721**, 2: 369-372.
- 11- Baeyens W. R. G., Van der Weken G., Van Overbeke A., Zhang X. R. 1995. A comparative study for determination of ibuprofen in pharmaceutical preparations using different internal column diameters. *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 6: 259-260.
- 12- Sochor J., Klimes J., Sedlacek J., Zahradnick M. 1995. Determination of ibuprofen in erythrocytes and plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**, 7: 899-903.
- 13- Hermann T. W., Flig E., 1995. Determination of ibuprofen and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Chem. Anal.*, **40**, 4: 543-548.
- 14- Berber G., Staab R., Voegtli Junkert U., 1993. Solid phase extraction for the determination of ibuprofen by means of HPLC and UV detection in the lower ng range in plasma and urine. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **347**, 12: 513-515.
- 15- Erram S. V., Doshi S. M., Kulkarni V. M., 1992. Simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in tablets by RP-HPLC. *Indian J. Pharm.*, **54**, 3: 122-124.
- 16- Berber G., Staab R., Wagener H. H., 1990. Determination of ibuprofen in plasma, synovial fluid and tissue by HPLC and electrochemical detection in the lower ng-range. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **336**, 3: 238
- 17- Ran H. L., Aroor A. R., Rao P. G., 1993. High-performance liquid chromatographic determination of ibuprofen and mefenamic acid in combined dosage forms. *East Pharm.*, **36**, 422: 125-126.
- 18- Castillo M., Smith P. C., 1993. Direct determination of ibuprofen and ibuprofen acyl glucuronide in plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J. Chromatogr.*, **614**, 1: 109-116.
- 19- Sen A. K., Bandyopadhyay A., Podder G., Chowdhury B., 1990. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of ibuprofen and ethambutol in pharmaceutical dosage form. *J. Indian Chem. Soc.*, **67**, 5: 443-444.
- 20- Nahata M. C., 1991. Determination of ibuprofen in human

plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, **14**,1: 187-192.

**21-** Glowka F. K., 1998. HPLC methodology for determination of ibuprofen enantiomers to be used in pharmacokinetics. *Chem. Anal.*, **43**,1:79-84.

**22-** Pirkle W. H., Liu Y., 1996. Incremental development of chiral selectors for underivatized profens. *J. Chromatogr.* **736**,1-2: 31-38.

**23-** Gilar M., Tesarova E., Deyl Z., 1996. Influence of mobile phase composition on the retention and enantioseparation of profens in HPLC on beta-cyclodextrin stationary phase. *Chem. Listy*, **90**,7: 461-466.

**24-** Lau Y. Y., 1996. Determination of ibuprofen enantiomers in human plasma by derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **19**,13: 2143-2153.

**25-** Pehourcq F., Lagrange F., Labat L., Bannwarth B., 1995. Simultaneous measurement of flurbiprofen, ibuprofen and ketoprofen enantiomer concentrations in plasma using L-leucinamide as the chiral coupling component. *J. Liq. Chromatogr.*, **18**,20: 3969-3979.

**26-** Asami M., Nakamura K. I., 1995. Enantiomeric separation and recognition mechanism of 2-arylpropionic acid derivatives by high-performance liquid chromatography using a chiral column. *Chirality*, **7**,1: 28-33.

**27-** "British Pharmacopoeia" -BP-. 1998. CD-ROM is published by Stationary Office Ltd. (Norwich).

**28-** "The United States Pharmacopoeia" - USP XXIII 1995. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. (Rockville). 3418, 2941-2942, 4217-4218.

**29-** The United States Pharmacopoeia - USP XXIII 1995. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. (Rockville). 3417-3418.

**30-** Quatrocchi, O.A.; Andrizzi, I.S. 1992. "Introducción a la HPLC". Artes Gráficas Farro SA. (Buenos Aires). 279-282.

**31-** The United States Pharmacopoeia - USP XXIII 1995. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. (Rockville). 1982-1984.

**32-** Swartz M.E. y Krull I.S. 1998. "Validation of chromatographic methods", *Pharmaceutical Technology* **22**,3:46-60.