

# DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE LA PUREZA CROMATOGRÁFICA Y CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE IBUPROFENO Y 4-ISOBUTILACETOFENONA EN MATERIAS PRIMAS

Guerrero Florencia

<sup>A</sup> Laboratorio de Control de Calidad (LCCM). Cátedra de Control de Calidad. <sup>B</sup> Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB). Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Área: Ciencias Biológicas  
Sub-área: Bioquímica  
Grupo: X

**Palabras claves:** cromatografía líquida, 4-isobutilacetofenona, ibuprofeno.

## INTRODUCCIÓN

El ibuprofeno (IBU, fórmula molecular  $C_{13}H_{18}O_2$ ) es un fármaco derivado del ácido propiónico que pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos. Posee actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria (Goodman, L. S.; Gilman, A., 2007) y se comporta como inhibidor no selectivo de la ciclo-oxigenasa, reduciendo la síntesis de prostaglandinas. Para la evaluación de la pureza cromatográfica de IBU y su determinación, la Farmacopea de Estados Unidos (USP) (USP 37) describe dos métodos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC en inglés) en fase reversa: respectivamente, uno con detección UV a 214nm y otro a 254nm. En ésta Farmacopea, la única impureza señalada para analizar es la 4-isobutilacetofenona (4-IBAF), compuesto que se forma por fotodegradación de IBU y genera efectos adversos sobre tejido conectivo, glóbulos rojos y sistema nervioso central (Gasco-Lopez, A.; Izquierdo-Hornillos, R.; Jimenez, A., 1999, Ruggeri, G.; Ghigo, G.; Maurino, V.; Minero, C.; Vione, D., 2013, Castell, J.; Gomez, M.; Miranda, M.; Morera, I., 1987). Dado el extendido uso o abuso de IBU como medicación de venta libre y su consumo en el tratamiento de enfermedades crónicas como artritis, es fundamental aplicar estrategias de control analítico que permitan garantizar la calidad, seguridad y eficacia de este medicamento (Caviglioli, G.; Posocco, V.; Parodi, B.; Cafaggi, S.; Alzati, A.; Bignardi, G., 2002).

## OBJETIVO

Desarrollar un método analítico por HPLC en fase reversa y detector de arreglo de diodos indicativo de estabilidad para la evaluación de la pureza cromatográfica y la determinación simultánea de ibuprofeno (IBU) y de (4-IBAF) en materias primas.

## METODOLOGÍA

### Reactivos y equipos

Las corridas cromatográficas se realizaron con una *solución ácida* preparada con ácido fosfórico y un *diluyente* formado por una mezcla de acetonitrilo (ACN) y *solución*

Proyecto: CAI+D 2016 - PI 5012015100095 LI: "Desarrollo de estrategias protocolizadas para el control analítico de fármacos y nutraceuticos en muestras complejas".

Director del proyecto: Cámara, M. S.

Director y Co-Director delcientibecario: Cámara, M. S; De Zan, M. M.

Investigadores formadores: Alasino, A.

ácida (50:50) en un equipo HPLC Agilent Serie 1260. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron con el *software* Chemstation v.B 0103.

Se trabajó con un estándar secundario de IBU (solución stock: 100 mgmL<sup>-1</sup> en ACN) obtenido a partir de una materia prima caracterizada y valorada utilizando un estándar primario USP como referencia y un estándar USP de 4-IBAF (solución stock: 0.5mgmL<sup>-1</sup> en ACN). Se preparó una *solución estándar combinada* con 5.0 mg mL<sup>-1</sup> de IBU y 5.0 µgmL<sup>-1</sup> de 4-IBAF. Para el estudio de degradación forzada se utilizó HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, para algunos de éstos estudios se utilizó una cámara climática constante HPP110 Memmert.

### **Estudios de degradación forzada**

Para los ensayos en estado líquido, la solución estándar de IBU de 10 mg mL<sup>-1</sup> se sometió a condiciones de estrés para degradación ácida (una hora con HCl 1M a baño maría), básica (una hora con NaOH 1M a baño maría), oxidativa (una hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % p/v a baño maría), hidrolítica (una semana a 50°C en cámara de estabilidad) y fotolítica (un día de exposición de luz solar). Finalizado el estrés de cada prueba se llevó a una concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup> con ACN. Para los ensayos en estado sólido, se sometió la materia prima a estrés térmico (un día a 105°C) y por humedad (una semana a 50°C y humedad 80%), para luego preparar una solución de 5 mg mL<sup>-1</sup> en ACN. Obtenidas las soluciones, se realizó el análisis cromatográfico junto a soluciones estándar no sometidas a estrés, registrándose los tiempos de retención (TR) para los distintos compuestos.

### **Procedimiento de validación del método**

Se evaluaron selectividad, linealidad, precisión, exactitud y límite de cuantificación (LOQ).

Selectividad: se analizaron las muestras obtenidas en los ensayos de degradación forzada. La separación entre picos se evaluó analizando la resolución (R), se consideró aceptable una separación con  $R > 2.5$ . Se examinó la pureza de los picos obtenidos, se consideró puro un pico con factor de pureza de al menos 99.0%.

Linealidad y rango: para IBU, se trabajó con soluciones estándar en cinco niveles de concentración (80, 90, 100, 110 y 120 % de la esperada en la solución muestra), por triplicado. Para la 4-IBAF se trabajó con soluciones estándar en seis niveles de concentración (LOQ, 20, 50, 80 100 y 120 % del límite aceptado en la especificación). Se hicieron triplicados en los puntos centrales y quintuplicados en el primer y último punto. Se graficaron las áreas de los picos en función de las concentraciones de calibración para IBU y para 4-IBAF. Los resultados se analizaron por regresión lineal de mínimos cuadrados.

El LOQ para 4-IBAF se estimó a partir de cromatogramas de una serie de soluciones de concentraciones diferentes y mediante el cálculo de la relación señal/ruido (S/R) y se determinó el nivel de concentración con relación igual a 10.

Precisión: se evaluó en dos condiciones, repetitividad y precisión intermedia. Para IBU, se trabajó para repetitividad en tres niveles de concentración (80, 100 y 120 % de la esperada) por triplicado. Para la 4-IBAF se trabajó en tres niveles (LOQ, 100 y 120 % del límite aceptado en la especificación). Las muestras se prepararon por triplicado adicionando volúmenes de estándar a la materia prima de IBU. Se calculó la DER% para cada analito y concentración. Para precisión intermedia se repitieron las experiencias en días diferentes.

Exactitud: se trabajó con las muestras preparadas para el estudio de la precisión. Se determinó la concentración de 4-IBAF a partir de la curva de calibrado, se calculó la recuperación para cada nivel según la cantidad adicionada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Condiciones cromatográficas

Se trabajó con una columna C-18 de 4.6 x 100 mm, partículas de 3.5  $\mu\text{m}$  y con elución en gradiente con fase móvil compuesta por combinación de acetonitrilo y *solución ácida* (flujo: 2.0 mL/min por 15min, T: 25°C, volumen de inyección 5 $\mu\text{L}$ ). La detección se hizo a 254nm para valoración y a 214nm para pureza cromatográfica.

### Validación del método

En cuanto a la selectividad, en todos los cromatogramas se obtuvo una correcta separación entre los picos, como se muestra en la Figura 1 (los resultados para la R y para el factor de pureza muestran total concordancia con los criterios para selectividad). En el estudio de linealidad, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el valor observado y el valor crítico de  $F$  ( $p > 0.10$ ), se concluye que el modelo seleccionado es adecuado para los datos obtenidos y existe linealidad en todo el intervalo de concentraciones analizado. Para el LOQ de la 4-IBAF, se obtuvo un valor de 0.45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En el cálculo de la precisión, los valores obtenidos para la DER% para repetitividad y precisión intermedia para la determinación de IBU, muestran que todos están por debajo del criterio de aceptabilidad del 2.0 % para este parámetro. Los valores correspondientes a la DER% para la determinación de 4-IBAF, también muestran que todos están muy por debajo del criterio de aceptabilidad del 25.0 % para este parámetro (Maggio, R.; Vignaduzzo, S.; Kaufman, T., 2013). En cuanto a la exactitud, los valores de recuperación para la determinación de la 4-IBAF en los dos días diferentes de trabajo, se encuentran dentro del intervalo del 50 al 150%, establecido como criterio de aceptabilidad.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran la naturaleza indicativa de estabilidad del método propuesto, ya que el mismo es específico para la determinación de IBU y de 4-IBAF, dado que el análisis de la pureza de los picos correspondientes demuestra la ausencia de analitos que co-eluyan. Esto asegura que el mismo no presenta interferencias causadas por los productos de degradación generados.

El método propuesto tiene una ventaja de aplicación práctica comparado con el de la USP, ya que permite, utilizando las mismas condiciones de análisis, realizar simultáneamente la evaluación de la pureza cromatográfica y la determinación de IBU y 4-IBAF. Por lo tanto, se justifica su uso en el control de calidad rutinario de materias primas en laboratorios de análisis farmacéutico, así como en estudios de estabilidad.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Castell, J.; Gomez, M.; Miranda, M.; Morera, I.,** 1987. Photolytic degradation of ibuprofen. Toxicity of the isolated photoproducts on fibroblasts and erythrocytes. Photochemistry and Photobiology 46, 6: 991-996.

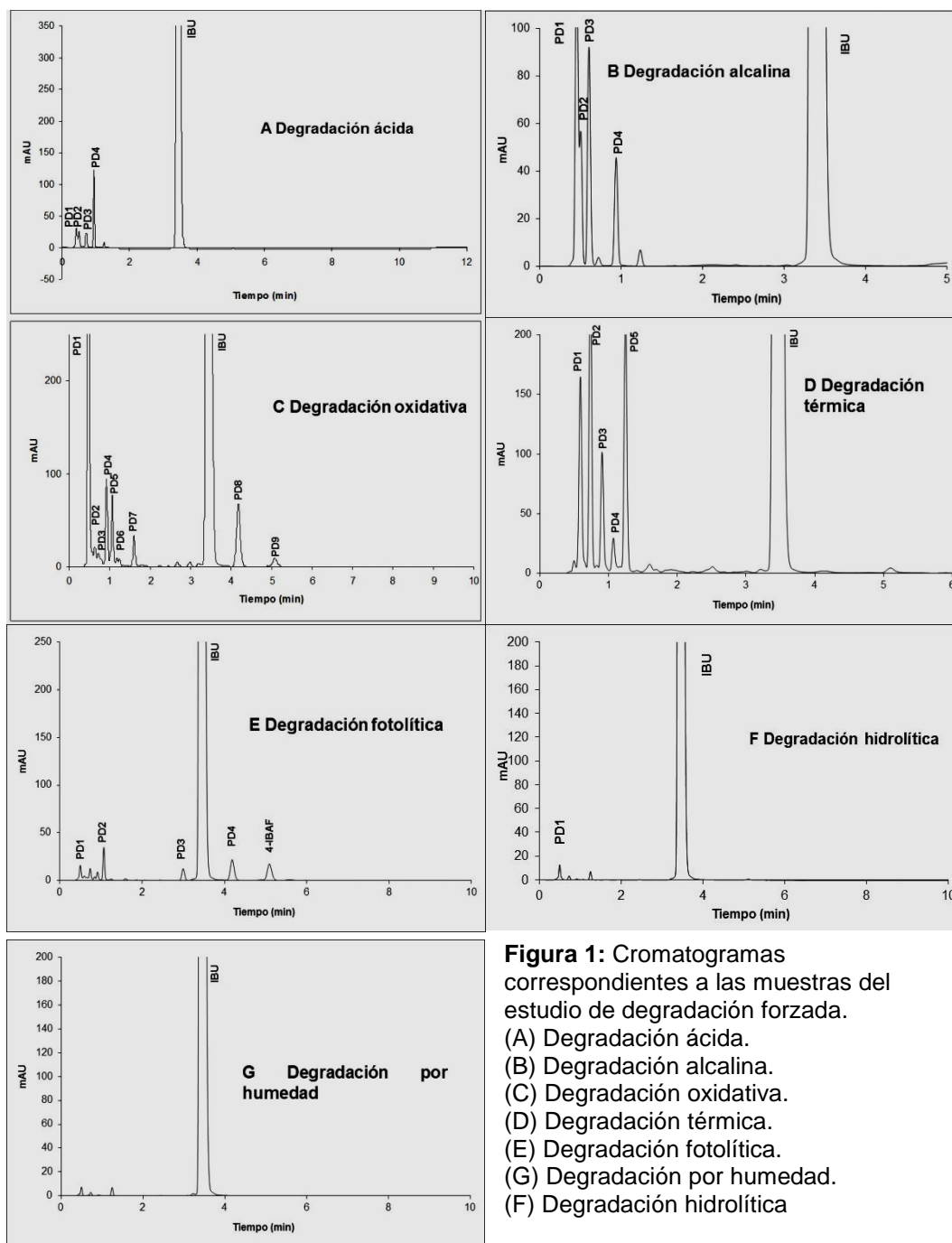
**Caviglioli, G.; Posocco, V.; Parodi, B.; Cafaggi, S.; Alzati, A.; Bignardi, G.,** 2002. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatment. J. of Pharm. and Biom. Anal. 30, 3: 499-509.

**Gasco-Lopez, A.; Izquierdo-Hornillos, R.; Jimenez, A., 1999.** LC method development for ibuprofen and validation indifferent pharmaceuticals. *J. of Pharm. and Biom. Anal.* 21, 1: 143-149.

**Goodman, L. S.; Gilman, A., 2007.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. MacGraw-Hill Interamericana Editores S. A. (Méjico). 698-700.

**Ruggeri, G.; Ghigo, G.;Maurino, V.; Minero, C.; Vione, D., 2013.**Photochemical transformation of ibuprofen into harmful 4-isobutylacetophenone: Pathways,kinetics, and significance for surface waters. *Water Research* 47, 16: 6109-6121.

**USP 37:** The United Stated Pharmacopeia (37th ed. 2014). United Stated Pharmacopeia Convention, Rockville, USA.



**Figura 1:** Cromatogramas correspondientes a las muestras del estudio de degradación forzada.  
 (A) Degradación ácida.  
 (B) Degradación alcalina.  
 (C) Degradación oxidativa.  
 (D) Degradación térmica.  
 (E) Degradación fotolítica.  
 (G) Degradación por humedad.  
 (F) Degradación hidrolítica