

Validación de métodos analíticos para los estudios de estabilidad del naproxeno en supositorios para uso infantil y adulto

Validation of analytical methods for the stability studies of naproxen suppositories for infant and adult use

Yaslenis Rodríguez Hernández,^I Yania Suárez Pérez,^{II} Oscar García Pulpeiro,^{III} Tania Rodríguez Borges,^{IV} Hugo Alonso Romero^V

^I Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Ciencias Tecnología y Control de Medicamentos. Instructor. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{II} Doctora en Ciencias en Ciencias Farmacéuticas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{III} Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Ciencias en Tecnología y Control de Medicamentos. Empresa Laboratorio "Roberto Escudero Díaz". La Habana, Cuba.

^{IV} Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Laboratorio "Reinaldo Gutiérrez". La Habana, Cuba.

^V Licenciado en Ciencias Químicas. Empresa Laboratorio "Roberto Escudero Díaz". La Habana, Cuba.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizaron los estudios analíticos y de validación para su aplicación en los estudios de estabilidad de las futuras formulaciones de supositorios de naproxeno para uso infantil y adulto. Se determinaron los factores que más influyeron en la estabilidad del naproxeno; la mayor degradación ocurrió en el medio ácido, oxidante y por acción de la luz. Se evaluó un método por cromatografía líquida de alta resolución, el cual mostró adecuado desempeño para cuantificar naproxeno en supositorios y fue selectivo frente a los productos de degradación. Se obtuvo un límite de cuantificación de 3,480 µg, por lo que fue válido para la realización de dichos estudios. Adicionalmente, se evaluaron los parámetros especificidad para estabilidad, límites de detección y de cuantificación para el método por volumetría ácido-base semiacuosa directa validado anteriormente para control de calidad, lo cual mostró resultados satisfactorios. No obstante, los métodos volumétricos no se consideran indicadores de estabilidad, por lo que este método será utilizado conjuntamente con

los métodos cromatográficos de elección para determinar productos de degradación: cromatografía de capa delgada y cromatografía líquida de alta resolución.

Palabras clave: naproxeno, estabilidad, volumetría, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), validación, supositorios.

ABSTRACT

Analytical and validating studies were performed in this paper, with a view to using them in the stability studies of the future formulations of naproxen suppositories for children and adults. The most influential factors in the naproxen stability were determined, that is, the major degradation occurred in acid medium, oxidative medium and by light action. One high-performance liquid chromatography-based method was evaluated, which proved to be adequate to quantify naproxen in suppositories and was selective against degradation products. The quantification limit was 3,480 µg, so it was valid for these studies. Additionally, the parameters specificity for stability, detection and quantification limits were evaluated for the direct semi-aqueous acid-base method, which was formerly validated for the quality control and showed satisfactory results. Nevertheless, the volumetric methods were not regarded as stability indicators; therefore, this method will be used along with the chromatographic methods of choice, that is, thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, to determine the degradation products

Key words: naproxen, stability, volumetry, high-performance liquid resolution, validation, suppositories.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los métodos oficiales descritos para el análisis del naproxeno materia prima, uno de los más empleados es la valoración ácido-base semiacuosa directa de una disolución de naproxeno en metanol, utilizando hidróxido de sodio como valorante y fenolftaleína como indicador. Este es un método recomendado para el control de calidad, por resultar simple y rápido. Se basa en la reacción de neutralización que tiene lugar entre el COOH libre del naproxeno y el valorante.¹⁻³

Otro de los métodos reportados es la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de naproxeno en supositorios y en tabletas gastroresistentes, empleando detector UV a 254 y 262 nm respectivamente.³ Este método también se propone para la cuantificación de naproxeno en tabletas, tabletas de liberación retardada y en suspensión oral con un detector UV a 254 nm.²

Teniendo en cuenta las ventajas del método volumétrico, así como la facilidad de aplicación de esta técnica en cualquier laboratorio, se valoró su aplicación como un método confiable pero a la vez, rápido, sencillo y de bajo costo, para el control de rutina de la nueva formulación una vez introducida, para lo cual se realizó su validación exhaustiva.⁴ En el presente trabajo se valoró, conjuntamente con el método por CLAR que es método indicador de estabilidad por excelencia, como una

alternativa ventajosa para los estudios de estabilidad del naproxeno en supositorios para uso infantil y adulto.

MÉTODOS

Desarrollo de métodos para estudios de estabilidad de naproxeno en supositorios. Validación

Cromatografía líquida de alta resolución

Selección de las condiciones cromatográficas

Se utilizó el mismo método descrito para la cuantificación de naproxeno en supositorios.³

Se trabajó en un cromatógrafo KNAUER smartline utilizando como fase estacionaria una columna de acero inoxidable Konic 5 μm C18 (25 cm x 0,4 mm) y como fase móvil una mezcla de un volumen de solución de acetato de sodio 0,52 % m/v ajustada a pH= 5,8 con ácido acético glacial y un volumen de metanol. Se trabajó a una velocidad de flujo de 2 mL/min, con detector UV a 254 nm y se utilizó un volumen de inyección de 20 μL .

Tratamiento de la muestra

Se empleó el mismo tratamiento empleado para los estudios de estabilidad del naproxeno utilizando la cromatografía en capa delgada (CCD).⁴ Se sometió el naproxeno, ingrediente farmacéutico activo (IFA), y la sustancia auxiliar (Rosupol) de la futura formulación de supositorios, a condiciones de estrés con el objetivo de obtener los posibles productos de degradación.

Las condiciones degradativas fueron las siguientes:

1. Pirólisis: naproxeno (materia prima) sometido a una temperatura de 200 ± 5 °C.
2. Medio ácido: 1 parte de HCl conc 1 N más 2 partes de agua más 7 partes de disolución de naproxeno en etanol al 2 % (m/v).
3. Medio básico: 1 parte de NaOH 1 N más 2 partes de agua más 7 partes de disolución de naproxeno en etanol al 2 % (m/v).
4. Medio oxidante: 3 partes de H_2O_2 al 30 % (v/v) más 7 partes de disolución de naproxeno en etanol al 2 % (m/v).
5. Luz natural: se preparó de 2 formas:
 - 7 partes de disolución de naproxeno en etanol al 2 % (m/v) más 3 partes de agua.
 - 10 mL de disolución de naproxeno al 2 % en etanol (m/v).

Ambas muestras fueron expuestas a la luz durante 60 días.

Las muestras expuestas a los medios: ácido, básico y oxidante fueron sometidas a reflujo por 16 h al igual que una disolución de naproxeno al 2 % en etanol (m/v).

Se preparó un patrón de naproxeno materia prima y se disolvió en etanol para lograr una concentración final de 5 % (m/v).

La muestra sometida a pirólisis se disolvió en etanol para lograr una disolución de igual concentración que el patrón de naproxeno (5 % m/v).

También se prepararon muestras con la grasa que es el excipiente del supositorio de la siguiente forma:

1. Grasa dura pura (20 g).
2. Naproxeno (0,5 g) más grasa dura (20 g).

Todas las muestras que contienen grasa se colocaron en la estufa a 105 ± 5 °C durante 7 días, transcurrido este tiempo se pesó de cada muestra 0,5 g; se trasvasaron a volumétricos de 10 mL y se completó a volumen con etanol.

Procesamiento aplicado a muestras de supositorios previo a la aplicación del método

Se consideró la metodología para el tratamiento de muestra reportado en la Farmacopea Británica del 2009³ para el control de calidad de naproxeno supositorios.

Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para estabilidad

Teniendo en cuenta que el método se reporta para el control de calidad³ (categoría I), se procedió a la evaluación de los parámetros requeridos para su utilización para estudios de estabilidad (categoría II cuantitativa).

Selectividad para estabilidad

Se inyectaron en el cromatógrafo iguales volúmenes (20 µL) de las mismas disoluciones obtenidas al realizar los 5 tratamientos degradativos aplicados al naproxeno IFA y de las muestras resultantes de los tratamientos que contenían grasa dura.

Criterio de aceptación: el método fue suficientemente selectivo para estabilidad si se obtiene adecuada resolución entre el pico correspondiente al naproxeno (solución de referencia) y los posibles productos de degradación del IFA y la base del supositorio. Es decir, si no coincide ninguno de los tiempos de retención (tr) de las diferentes señales analíticas registradas.

Límite de cuantificación (Lc) y límite de detección (Ld)

Se estimaron a partir de la curva de regresión, aplicando el procedimiento tradicional.⁵ Una vez realizada la estimación teórica del Lc, se procedió a su comprobación experimental. Para ello fue necesario preparar por triplicado muestras equivalentes a la concentración estimada, procediendo al análisis cuantitativo a través de este método. Se calculó el recobrado, determinando el cociente entre % recuperado y % añadido. Este parámetro se expresó en % y se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

Volumetría ácido-base semiacuosa directa. Validación para estabilidad

Se utilizó el mismo método volumétrico validado para control de calidad,⁴ el cual se validó para los estudios de estabilidad teniendo en cuenta los parámetros adicionales exigidos para la categoría II, los que se presentan a continuación.

Especificidad para estabilidad

Se evaluó la especificidad del método frente a los posibles productos de degradación del naproxeno. Para esto se emplearon las mismas disoluciones resultantes de la aplicación de los tratamientos degradativos correspondientes a las pruebas de estrés, aplicadas al naproxeno materia prima. En este caso dichas disoluciones se mezclaron y homogenizaron. Posteriormente se utilizaron para cargar cantidades equivalentes al 100 % de placebo. Además se sometió a degradación térmica por triplicado muestras placebo.

Se compararon los volúmenes de valorante consumidos en cada caso con respecto al consumido por naproxeno SR (sin degradar) para verificar la presencia o no de interferencias.

Criterio de aceptación: el método se consideró específico frente a los productos de degradación si en presencia de estos, no se obtiene una respuesta analítica mayor o igual al 1 %.

Límite de detección y límite de cuantificación

Se estimaron de la misma forma descrita en el método por CLAR, teniendo en cuenta que en este caso la variable dependiente es la concentración real expresada en miligramo por mililitro. Además se llevó a cabo la comprobación experimental del Lc por triplicado y la determinación del recobrado medio, la DE y el CV.

RESULTADOS

Desarrollo de métodos para estudios de estabilidad de naproxeno en supositorios. Validación

Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución

Selectividad del método para estabilidad

En la tabla 1 se presentan los resultados del naproxeno patrón y los correspondientes a las diferentes condiciones degradativas aplicadas al naproxeno materia prima. Se realizó la comparación de los tr obtenidos con respecto al comportamiento observado para el patrón.

Tabla 1. Resultados de la selectividad del método por CLAR para estudios de estabilidad del naproxeno

No.	Tiempo de retención (min)	Área bajo la curva	Observaciones
1	1,217	939	Resultados para el patrón de naproxeno
2	1,483	7 829	
3	1,900	2 270	
4	2,417	2 322	
5	2,667	6 539	
6	3,017	2 048	
7	3,367	1 709	
8	4,417	5 212 497	
9	6,633	342	
10	7,050	63	
11	19,300	17 174	
12	0,700	279	Medio oxidante, etanol más reflujo
13	1,650	37 300	Luz
14	5,617	682	Luz, etanol más reflujo
15	8,633	4 883	Pirólisis, medio ácido, medio básico, medio oxidante
16	11,283	27 183	medio ácido, medio oxidante
17	13,033	5 915	Pirólisis, medio ácido, medio básico, medio oxidante, luz, etanol más reflujo
18	15,700	13 843	Pirólisis, medio oxidante, luz

Para el patrón de naproxeno se registraron en total 11 picos, 7 picos con t_r inferiores al pico principal ($t_r = 4,417$) y 3 picos con t_r superiores. En este caso, se utilizó un patrón internacional. No obstante, los resultados obtenidos demostraron la presencia de las diferentes sustancias relacionadas que pueden llegar hasta 14 compuestos diferentes.³

En la muestra sometida a pirólisis, la mayor cantidad de picos diferentes al patrón (15, 17 y 18) se presentaron a t_r superiores al pico principal, lo cual indica una mayor apolaridad de estos compuestos.

Se mostró coincidencia en 2 picos para el medio ácido (15 y 17), sin embargo, adicionalmente se presentó otro a $t_r = 11,283$ min (16).

En medio oxidante, apareció un nuevo pico de bajo t_r (12) y se repitieron los mismos picos que en el medio ácido (15, 16 y 17) y uno de los detectados para pirólisis (18).

En presencia de la luz fueron detectados 2 picos adicionales al inicio del cromatograma (13 y 14). Además se incrementaron significativamente las áreas bajo la curva de los picos 1 y 3 del cromatograma del patrón.

En la figura se muestran los cromatogramas que corresponden al análisis de la base del supositorio y su degradación térmica en ausencia y en presencia del naproxeno.

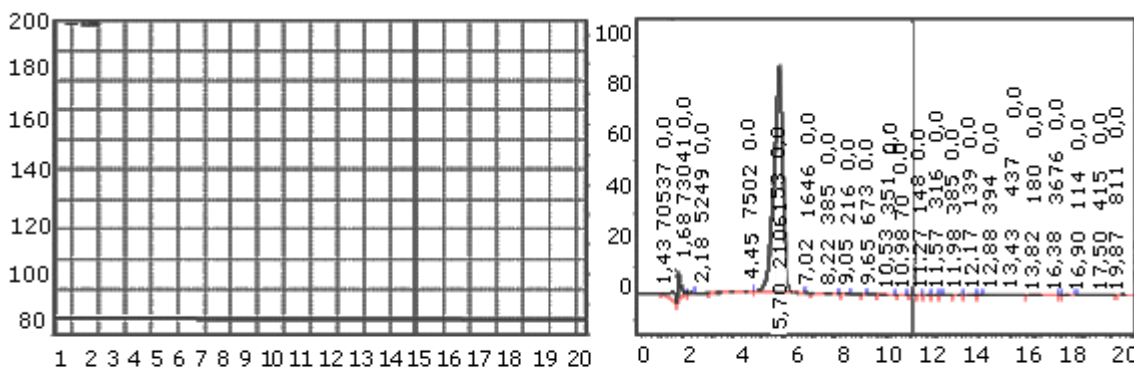


Fig. Cromatogramas de la selectividad para estabilidad de los componentes de la base degradados térmicamente (A) y en presencia de naproxeno (B).

En los cromatogramas mostrados no se detectó ninguna señal analítica adicional al patrón de naproxeno, por lo que se demostró la selectividad del método en estas condiciones.⁴

Límite de detección y límite de cuantificación

Los valores utilizados en la estimación de los Ld y Lc se resumen en la tabla 2, así como los resultados obtenidos para estos parámetros.

Tabla 2. Resultados del procesamiento estadístico para linealidad y exactitud. Sensibilidad del método por CLAR

Resultados		Criterio de aceptación
Linealidad del método	Exactitud del método	
$y = 0,9981x + 0,013$	$y = 0,9638x + 0,9676$	$y = bx + a$
$r = 0,9999$	$r = 0,9998$	$r \geq 0,990$
$r^2 = 0,9998$	$r^2 = 0,9941$	$r^2 \geq 0,980$
$t_{ex} < t_{tab} (\alpha = 0,05; n = 7)$	$t_{exp} < t_{tab} (\alpha = 0,05; n = 7)$	$t_{exp} < t_{tab}$
$t \Rightarrow 0,420 < 2,360$	$t \Rightarrow 1,044 < 2,360$	no significativo (2,360)
$b = 0,9981$	$b = 0,9638$	$b \approx 1$
$t = 358,83$	$t = 34,44$	t alta
$p = 0,0000$	$p = 0,0000$	$p \ll 0,05$
$CV_f = 0,273 \%$	$R = 99,94 \%$	$CV_f < 5 \%$
	$CV = 0,273 \%$	$R = 98-102 \%$
		$CV < 2 \%$

Sensibilidad del método
 Pendiente de la curva de calibración del método (b): 0,998
 Ybl: 0,968
 Sbl: 0,760
 Ld (μg): 1,721
 Lc (μg): 3,480

La pendiente de la curva de calibración (b) se estimó a partir de los resultados obtenidos en la evaluación del desempeño de este método (tabla 2). Por tratarse de un método oficial, no requiere validación exhaustiva.

El Lc estimado teóricamente ($L_c = 3,48 \mu\text{g}$), se consideró adecuado. Se comprobó experimentalmente el Lc obteniendo resultados satisfactorios. La recuperación promedio fue de $99,77 \pm 0,23 \%$.

Validación del método volumétrico para estabilidad

Evaluación de la especificidad del método volumétrico frente a productos de degradación del fármaco

En la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 3. Resultados de de la especificidad del método volumétrico frente a productos de degradación del fármaco. Sensibilidad del método

Especificidad del método						
Parámetro	mL consumidos en la valoración					
	Blanco	Placebo	Placebo degradado	SR	Muestra	Muestra contaminada con pd *
Resultados	0,100	0,100	0,100	9,300	9,300	9,300
	0,100	0,100	0,100	9,400	9,300	9,200
	0,100	0,100	0,100	9,200	9,200	9,200
Media	0,100	0,100	0,100	9,300	9,266	9,233
Recobrado medio	100,358 %					

* Muestra contaminada con producto de degradación.
 Sensibilidad del método
 Pendiente de la curva de calibración del método (b): 0,967
 Ybl: 0,011
 Sbl: 0,028
 Ld (mg): 0,040
 Lc (mg): 0,107

Como puede apreciarse, los productos de degradación del naproxeno no causaron interferencia en la determinación, ya que los volúmenes de valorante resultantes para la SR y las muestras sin productos de degradación o con estos, no difieren apreciablemente.

Evaluación de la sensibilidad del método volumétrico para aplicación a estudios de estabilidad

Los límites de detección y cuantificación se presentan en la tabla 3.

Como era de esperar, el método volumétrico no fue capaz de responder frente a bajas concentraciones de analito, pues se trabajó en el rango de la macro escala. Sin embargo, para el estudio de la estabilidad del naproxeno, los resultados obtenidos fueron satisfactorios, pues el $L_c = 107 \mu\text{g}$, representó niveles de degradación del 46,5 %.

Para la comprobación experimental se trabajó a concentraciones cercanas al L_c , verificando una elevada recuperación del analito de $98,96 \pm 1,82 \%$.

DISCUSIÓN

Desarrollo y validación del método por cromatografía líquida de alta resolución

Las condiciones cromatográficas empleadas responden a un sistema de fase reversa, en el cual el naproxeno presenta mayor afinidad por la fase estacionaria apolar que por la fase móvil que es polar. Las ventajas de la CLAR, entre las que se destacan su elevada selectividad y sensibilidad, lo colocan como método de elección para el seguimiento de la estabilidad química de los IFA en los estudios de estabilidad en matrices de diferente grado de complejidad.

En el caso que se analiza, solo coexisten en la matriz: IFA, sus posibles productos de degradación y Rosupol, único excipiente utilizado como base en las futuras formulaciones de supositorios, además de los posibles productos de degradación de la base. Estos últimos, según resultados de los estudios de estabilidad por CCD,⁴ no se forman ni siquiera en condiciones muy drásticas de calentamiento.

Por tratarse de un método de farmacopea, el cual no ha sido modificado; solo se requiere evaluación del desempeño para su aplicación al control de calidad (tabla 2). Sin embargo, al proponerlo con un uso diferente (estudio de estabilidad), fue preciso evaluar al menos, aquellos parámetros que se exigen en la categoría II cuantitativa.

La detección de 5 picos adicionales en el medio oxidante corroboró el impacto de este factor en la degradación del naproxeno, en correspondencia con los estudios de otros autores.⁶ La resolución fue adecuada y se obtuvieron valores superiores a 1,5; por lo que el método fue suficientemente selectivo para el fin con el cual se propone.

Frente a la luz se obtuvieron compuestos de mayor polaridad que el naproxeno, resultados que concordaron con los obtenidos por CCD.⁴

Existió en general buena correspondencia entre los resultados de CCD⁴ y CLAR ya que fueron precisamente las muestras sometidas al medio ácido y a la luz, las que sufrieron mayor degradación. Por tanto, fueron estos los factores degradantes de mayor impacto sobre la estabilidad del naproxeno. Se detectaron gran cantidad de picos por CLAR para el medio oxidante; sin embargo, por CCD⁴ solo se observó una importante disminución de la intensidad de la mancha principal y otra muy tenue en el punto de aplicación, lo que refleja la menor sensibilidad del método por CCD respecto a la CLAR en las condiciones del estudio.

El Lc estimado teóricamente ($L_c = 3,48 \mu\text{g}$), se consideró adecuado, pues se encuentra próximo a concentraciones de naproxeno equivalentes al 30 %, respecto al rango de interés analítico (50-150 % que equivale a concentraciones de 5 a 15 $\mu\text{g/mL}$). En los estudios de estabilidad, una vez alcanzado el 10 % de degradación, se consideran superados los límites permisibles; por tanto, en la práctica, no se necesita detectar concentraciones tan bajas del analito (34,8 %). Posteriormente se comprobó experimentalmente el Lc y se obtuvieron resultados satisfactorios. El método fue suficientemente sensible para el propósito con que fue desarrollado, pues fue capaz de cuantificar una cantidad equivalente al 65,2 % de degradación del principio activo.

Resultados de la validación del método volumétrico para estabilidad

Evaluación de la especificidad del método volumétrico frente a productos de degradación del fármaco

Los resultados obtenidos fueron los esperados, teniendo en cuenta que los productos de degradación del naproxeno informados hasta el momento en la bibliografía,^{4,6} no presentan el grupo carboxilo libre, que es en definitiva, el grupo analíticamente activo que justifica la aplicación de este método. Además fueron similares los resultados de la valoración del blanco, del placebo degradado y sin degradar.

Por esta razón, el método volumétrico resultó ser específico frente a los posibles productos de degradación del naproxeno.

Evaluación de la sensibilidad del método volumétrico para aplicación a estudios de estabilidad

La validación de métodos cuantitativos para estudios de estabilidad requiere adicionalmente la determinación de los límites de detección y de cuantificación. Los métodos volumétricos son en general poco sensibles, por lo que la determinación de la sensibilidad resulta de vital importancia.

A partir de los resultados alcanzados, quedó demostrada la capacidad de la técnica volumétrica en estudio, para cuantificar niveles bajos de concentración (incluso equivalentes al 53,5 % de concentración de analito), a pesar de no constituir un método de elección como indicador de estabilidad.

Por todo lo anterior, el método volumétrico diseñado para el control de rutina en el producto recién elaborado, puede aplicarse con fines cuantitativos en muestras de naproxeno supositorios envejecidos, ya que además de selectivo fue lo suficientemente sensible para el análisis en la matriz estudiada.

No obstante, los métodos volumétricos no se consideran indicadores de estabilidad, por lo que este método será utilizado conjuntamente con los métodos cromatográficos de elección para determinar productos de degradación: CCD y CLAR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sádecká J, Èakrt M, Hercegová A, Polonský J, Skaèáni I. Determination of ibuprofen and naproxen in tablets. J Pharm Biomed Analysis. 2001:25,881-91.

2. United States Pharmacopoeial Convention and National Formulary 25st. USP XXX. United States Pharmacopoeia Convention. 30 ed. Rockville: Mack Printing; 2007. [Monographic in CD-ROM].
3. British Pharmacopoeia Volume I & II Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances Naproxen. London: Stationery Office; 2009. [Monographic in CD-ROM].
4. Rodríguez Y, Suárez Y, Pulpeiro O. Estudios analíticos y de validación del naproxeno en supositorios. Tesis para optar el título de Maestro en Ciencias en Tecnología y Control de Medicamentos. Universidad de La Habana. Facultad de Farmacia y Alimentos. La Habana, 2010.
5. Quatrocchi, A, Abelairra de Andizzi I, Laba F. Introducción a la HPLC. Aplicación práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA; 1992. p. 1025.
6. Adhoum N, Monser L, Toumi M, Boujlel K. Determination of naproxen in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry at a platinum electrode. Analytica Chim Acta. 2003;495:69-75.

Recibido: 2 de mayo de 2011.
Aprobado: 18 de junio de 2011.

Dra. C. *Yania Suárez Pérez*. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Universidad de La Habana. Ave 23 No. 21 425 e/ 214 y 222. La Coronela, La Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: yaniasp@ifal.uh.cu, yania_as@yahoo.es