

Optimización y validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Ketoprofeno 100 mg en comprimidos con cubierta entérica

Adequacy and validation of a method for RP-HPLC for determination of Ketoprofen 100 mg enteric coated tablet

MARISABEL BOR*, PATRICIA BAFFI, LISSETH CORREA, MARÍA FÁTIMA FERNANDES, JENILYND FERNÁNDEZ, ZULHET GONZÁLEZ, MIDABEL GUILLÉN, SONDRÁ LÓPEZ, DUBRASKA VEGA

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la optimización y validación de una metodología analítica para la determinación de ketoprofeno en comprimidos con cubierta entérica por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) con un detector de arreglo de diodos. Este método fue validado según los requerimientos establecidos en la USP. Las condiciones analíticas utilizadas en este método fueron las siguientes: una columna cromatográfica C-18, 3,9 mm x 300 mm, 10 µm, 125 Å y una fase móvil de acetonitrilo: agua: buffer fosfato pH = 3,5 (58:40:2), un flujo de 1,5 mL/min y la longitud de onda de detección fue de 255 nm. La duración de las corridas cromatográficas se encuentra alrededor de los 5 minutos. Las curvas de calibración fueron lineales en el rango 0,064 a 0,220 mg/mL. La evaluación de la selectividad del método se realizó utilizando el análisis de pureza de picos cromatográficos. Una vez realizadas las pruebas de degradación forzada, se utilizó el detector de diodos, encontrándose diferencias espectrales en la primera fase para las muestras sometidas a la exposición con peróxido de hidrógeno. Finalmente, el método descrito presentó precisión, exactitud, especificidad y reproducibilidad. Este método puede ser utilizado en análisis de rutina y pruebas de control de calidad, así como un indicador de estabilidad, gracias a su rapidez, precisión y reproducibilidad.

Palabras clave: Ketoprofeno, RP-HPLC, indicadores de estabilidad, validación.

ABSTRACT

The present work describes the optimization and validation of an analytical method for the determination of ketoprofen enteric-coated tablets by reversed-phase high resolution liquid chromatography (RP-HPLC) with a diode array detector. This method was validated according to the requirements established in the USP. The analytical conditions used in this method were: C-18 column, 3.9 mm x 300 mm, 10 µm, 125 Å, a mobile phase, acetonitrile: water: phosphate buffer pH = 3.5 (58:40:2), a flow rate of 1.5 mL/min and detection wavelength of 255 nm. The duration of the chromatographic run was around 5 minutes; the calibration curve obtained was linear over the range from 0.064 to 0.220 mg/mL. The evaluation of the selectivity of the method was done by peak purity. After the forced degradation tests were done, the diode detector showed spectral differences only in the first phase for the samples exposed to hydrogen peroxide. Finally, the method showed precision, accuracy, specificity and reproducibility, therefore, this analytical method can be applied as a stability-indicator, and as a routine method for quality control testing.

Key words: Ketoprofen, RP-HPLC, stability indicator, validation.

* Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 40109 - Caracas 1040A Venezuela. Telf. (58)212.6052751. e-mail: marisabel.bor@gmail.com

Introducción

Ketoprofeno (ácido 2-(3-benzoilfenil) propanoico) (Figura 1) es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido propiónico relacionado con el diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y el ácido tiaprofénico. Inhibe la actividad de la enzima ciclooxigenasa para provocar una disminución de la formación de precursores de las prostaglandinas y de los tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Los efectos analgésicos pueden implicar el bloqueo de la generación del impulso doloroso mediante una acción periférica por inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Bempong y Bhattacharyya, 2005). El ketoprofeno se puede encontrar en múltiples presentaciones, incluyendo cápsulas duras y blandas, jarabes, soluciones inyectables, gel, supositorios y comprimidos (Dvorák y col., 2004).

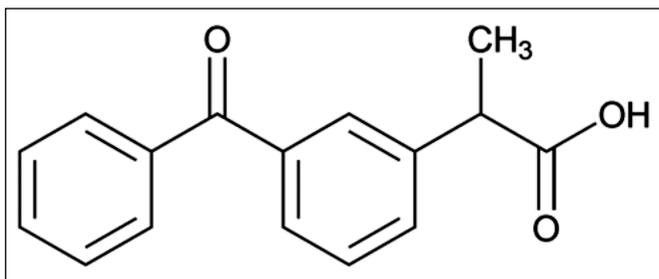


Figura 1. Estructura química de ketoprofeno.

La farmacopea de los Estados Unidos (USP 36, 2012) no reporta el método analítico para la determinación de ketoprofeno en comprimidos recubiertos, solamente establece el análisis de impurezas en la materia prima de ketoprofeno, utilizando como fase móvil una mezcla agua, acetonitrilo y buffer fosfato pH $3,5 \pm 0,05$ (55:43:2), a un flujo de 1,0 mL/min y la longitud de onda de máxima absorción de 233 nm. La USP 36 (2012) reporta el método analítico para la determinación de ketoprofeno en cápsulas, la fase móvil recomendada presenta la siguiente composición: acetonitrilo, agua y ácido acético (90:110:1), una columna C18 y la longitud de onda de 254 nm y para la determinación de impurezas orgánicas, la USP 36 (2012) establece las mismas condiciones cromatográficas reportadas para el análisis de impurezas en la materia prima de ketoprofeno.

En el año 2005 Bempong y Bhattacharyya reportaron el desarrollo y validación de un método para la determinación de ketoprofeno en gel e indicadores de estabilidad. Este método consistió en el uso de una fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y buffer fosfato (43:49:8) y una columna C18, a una longitud de onda de máxima absorción de 233 nm.

Estos autores realizaron estudios de indicadores de estabilidad, sometiendo a las muestras a condiciones de estrés, tales como: estrés oxidativo, exposición a la luz, exposición ácida y exposición alcalina.

En el presente trabajo se utilizaron como punto de partida los antecedentes consultados, con el propósito de optimizar las condiciones analíticas encontradas en la bibliografía y adecuarlas a un método analítico para la determinación de ketoprofeno en tabletas recubiertas y su posterior validación.

Materiales y métodos

REACTIVOS Y MATERIALES

Reactivos grado HPLC: acetonitrilo (Merck, Alemania) y agua, proveniente del equipo de destilación Cascada Ro Waters (Pall corporation) y seguidamente fue purificada en el ultrapurificador de agua Barnstead (Nanopure). Reactivos grado analítico: fosfato monobásico de potasio (J.T. Baker) y ácido ortofosfórico 85% (Fischer scientific). Ácido clorhídrico al 37% de Merck. Peróxido de hidrógeno al 35% de Riedel-de Haën. Hidróxido de sodio de Merck.

PATRÓN DE REFERENCIA

Se empleó un patrón de ketoprofeno pureza 100,02% del proveedor Rhenochem A.G.

MUESTRAS

Las muestras analizadas corresponden a un producto comercial de ketoprofeno 100 mg en comprimidos recubiertos, fabricados por un laboratorio nacional.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El análisis HPLC se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia de la casa comercial Waters®, conformado por una bomba modelo 600E, un inyector automuestreador modelo 717 plus acoplado a un detector de arreglo de diodos modelo PDA 996. El equipo cromatográfico está conectado a un computador con un programa Millennium 32®. Se utilizó una columna cromatográfica µbondapak C-18, 3,9 mm x 300 mm, 10 µm, 125 Å. Todas las pesadas se realizaron en una balanza analítica digital Mettler Toledo modelo AG 245. Las mediciones de pH fueron realizadas con el potenciómetro Orion Research modelo 601 A. El agua utilizada para todos los análisis proviene del equipo de destilación Cascada Ro Waters (Pall Corporation) y purificada en el ultrapurificador de agua Barnstead (Nanopure).

OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

El punto de partida de este trabajo fue la metodología analítica empleada en la USP 36 (2012) para la determinación de impurezas en la materia prima de ketoprofeno y el método propuesto por Bempong y Bhattacharyya (2005). En ambos casos la fase móvil estaba compuesta por una mezcla agua, acetonitrilo y buffer fosfato pH $3,5 \pm 0,05$. Se realizaron pruebas variando la composición de la fase móvil, al encontrar la proporción óptima, se procedió a validar el método con la fase móvil escogida, la cual se preparó mezclando acetonitrilo, agua y buffer fosfato pH = 3,5 en una proporción (58:40:2). Esta fase móvil fue filtrada a través de membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ y desgasificada con vacío y agitación durante 10 minutos. El flujo de la fase móvil fue de 1,5 mL/min.

PREPARACIÓN DE PATRONES

Se prepararon seis soluciones patrón de ketoprofeno disueltos en fase móvil, en un rango de concentraciones entre 0,064 a 0,224 mg/mL, a partir de una solución madre de ketoprofeno de concentración de 1 mg/mL. Los patrones fueron protegidos a la exposición de radiación UV durante todo el proceso de manipulación.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron preparadas pesando el equivalente a un peso promedio de los comprimidos (220 mg), esta cantidad de muestra fue transferida a un balón de 50 mL con fase móvil, se agitó mecánicamente y en baño de ultrasonido durante 10 minutos, finalmente se llevó a volumen con fase móvil. La solución obtenida fue filtrada con papel número 40, se tomó una alícuota de 2 mL y se diluyó a 25 mL con fase móvil. La solución obtenida fue filtrada por membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ antes de ser inyectada al cromatógrafo. Los patrones fueron protegidos a la exposición de radiación UV durante todo el proceso de manipulación.

DATOS ESPECTROSCÓPICOS

Los métodos usados como referencia para este trabajo reportaban que los análisis fueron realizados a una longitud de onda de 233 nm. En este trabajo se realizaron barridos de longitudes de onda desde los 220 nm hasta los 400 nm con un detector de arreglo de diodos (Figura 2). Se encontró que la longitud de onda de máxima absorbancia fue de 255 nm.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación del método se realizó siguiendo los lineamientos establecidos para la cuantificación de

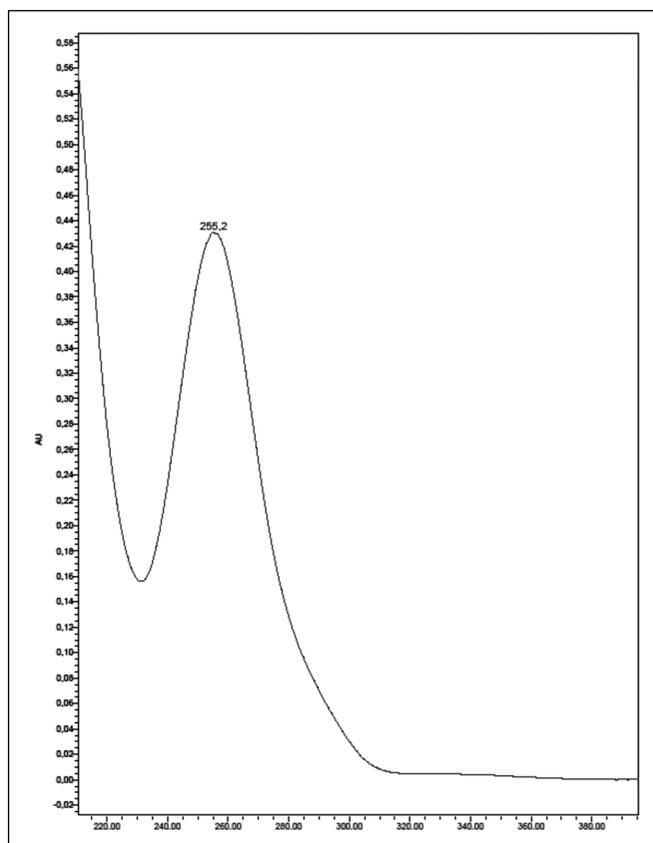


Figura 2. Espectro ultravioleta de ketoprofeno en el rango de 220 a 400 nm.

principios activos en productos farmacéuticos terminados (categoría I), específicamente en la sección <1225> de la USP 36 (2012). Los parámetros evaluados fueron los siguientes: adecuación del sistema, linealidad, especificidad, precisión y exactitud. Adicionalmente, se calcularon los límites de detección y cuantificación, ya que permiten determinar la sensibilidad del método.

ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Se determinó inyectando por sextuplicado el patrón y la muestra a la concentración de 100% (0,16 mg/mL) de la curva de calibración. A partir de los cromatogramas obtenidos, se calcularon los valores promedio de área, tiempo de retención, factor de cola (T), factor de capacidad (k) y número de platos teóricos (N) con los coeficientes de variación respectivos.

LINEALIDAD Y RANGO

La linealidad y rango fue determinada preparando e inyectando los patrones en un rango de concentración fue de 0,064 a 0,224 mg/mL. La regresión lineal se obtuvo a partir del promedio de las áreas obtenidas para cada concentración evaluada. Se calculó el coeficiente de correlación y la desviación estándar de la respuesta.

ESPECIFICIDAD

La especificidad fue evaluada mediante dos pruebas: evaluación de la pureza de pico cromatográfico y estudios de degradación forzada.

PUREZA DE PICO CROMATOGRÁFICO

Se evaluó la pureza del pico cromatográfico obtenido mediante el uso del detector de arreglo de diodos, en 4 fases. La primera fase consistió en comparar el espectro de cada punto del pico cromatográfico con el espectro del ápice y lo marca como fase 1. Si encuentra diferencias espectrales evalúa nuevamente el pico tomando en cuenta el espectro del ápice y el espectro de la impureza como referencia y lo marca como fase 2 y así continua hasta obtener las 4 fases. La interpretación de los gráficos de pureza está relacionada con los valores del ángulo de pureza (PA) y ángulo del umbral (TH), si PA es mayor que TH, se presume que hay una coelución del analito con una impureza, por lo tanto existen diferencias espectrales significativas.

Degradación forzada

Para comprobar si el método desarrollado es indicativo de la estabilidad, las muestras fueron sometidas a pruebas de estrés, para ello se pesó por sextuplicado el equivalente a un peso promedio de tabletas (220 mg), la cantidad pesada fue transferida cuantitativamente a balones aforados de 50 mL. Cada muestra se trató como se indica a continuación:

Muestra control: no se le realizó ningún tratamiento previo.

Termólisis: la muestra se colocó en baño de agua a 90 °C durante 4 horas.

Hidrólisis alcalina: se añadió a la muestra 20 mL de hidróxido de sodio al 4% y permaneció en reposo durante 7 días.

Hidrólisis ácida: se añadió a la muestra 20 mL de ácido clorhídrico al 10% y permaneció en reposo durante 7 días.

Fotólisis: la muestra se sometió a la exposición de radiación visible durante 7 días continuos.

Oxidación: se añadió a la muestra 20 mL de peróxido de hidrógeno al 35% y permaneció en reposo durante 7 días.

Una vez culminado el tiempo de exposición, cada muestra fue llevada a volumen con fase móvil, la concentración de ketoprofeno en las muestras fue de 0,16 mg/mL. Adicionalmente se preparó un patrón control de ketoprofeno a la concentración de 0,16 mg/mL. Los cromatogramas y los gráficos de

pureza de pico cromatográficos obtenidos fueron estudiados para cada una de las pruebas.

PRECISIÓN

Se determinó a través del cálculo del coeficiente de variación de los tiempos de retención y las áreas obtenidas de patrón y muestra para la precisión del sistema y de las concentraciones de las muestras para la repetibilidad y precisión intermedia.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se inyectó por sextuplicado el patrón correspondiente al 100% de la concentración en la curva de calibración (0,16 mg/mL), preparadas en fase móvil. La precisión se determinó calculando la desviación estándar de los tiempos de retención y las áreas obtenidas para el ketoprofeno.

REPETIBILIDAD

Se prepararon seis muestras al 100% de la concentración de prueba (0,16 mg/mL) según el procedimiento descrito. La determinación de la cantidad de ketoprofeno en las muestras, fue determinada usando la curva de calibración realizada durante los estudios de linealidad.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Las muestras fueron preparadas por un mismo analista durante seis días diferentes, según el procedimiento descrito, a una concentración de 0,16 mg/mL. Para determinar la cantidad de ketoprofeno en las muestras, se utilizó la curva de calibración realizada durante los estudios de linealidad.

EXACTITUD

La determinación de la exactitud se realizó según el método de agregado de estándar, el cual consiste en añadir a las muestras una cantidad conocida de patrón, para obtener tres niveles de concentración correspondiente a 75%, 100% y 125% de la curva de calibración. Se realizaron nueve determinaciones (tres replicas de las tres concentraciones).

Para calcular el porcentaje de recuperación se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = (C_{\text{fortificada}} - C_{\text{sin fortificar}}) * 100/CA$$

Donde CA es la concentración del analito añadido.

La prueba t nos permite demostrar que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%. En dicha prueba debe cumplirse que el valor de t observado es menor al t reportado en las tablas para un nivel de confianza de 95%, tomando

como valor verdadero 100. El cálculo de t se realiza a través de la siguiente fórmula:

$$t_{ob} = 100 - \%R/s \sqrt{n}$$

Donde: % R = porcentaje de recuperación
 s = desviación estándar
 n = número de determinaciones

LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación fueron estimados estadísticamente a partir de la regresión lineal y la desviación estándar de la respuesta (Miller y Miller, 2002), según las fórmulas: LD = 3,3 σ/S y LD = 10 σ/S, donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S es la pendiente de la curva de calibración.

Resultados y discusión

OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Las fases móviles empleadas para la optimización de la metodología analítica se presentan en la Tabla I. Los valores de factor de cola y número de platos teóricos encontrados para las tres pruebas realizadas presentaron mucha similitud entre sí. El factor que fue determinante para la selección de la fase móvil fue el factor de capacidad (k') este parámetro representa la retención de un compuesto por la fase estacionaria. Con el propósito de garantizar una eficiencia en la separación cromatográfica óptima, los valores de k' deberían estar comprendidos entre 2 y 10 (Quattrocchi y col., 1992). En función a ello, se decidió realizar la validación del método con la fase móvil B, ya que el valor de k' obtenido fue igual a 2,3.

Tabla I

Composición de las fases móviles utilizadas durante la optimización del método analítico y valores de factor de cola (T), factor de capacidad (k') y número de platos teóricos (N) obtenidos

Fase Móvil	Composición y Proporción de la Fase Móvil			Parámetros Cromatográficos			
	Agua	Acetonitrilo	Buffer fosfato pH=3,5	t _R (min)	T	k'	N
A	55	43	2	2,60	1,20	1,6	2650
B	58	40	2	3,30	1,26	2,3	2656
C	43	49	8	2,30	1,15	1,3	2500

t_R = tiempo de retención.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

ADECUACIÓN DEL SISTEMA

La evaluación de la adecuación del sistema cromatográfico, basado en los valores de tiempo de retención, área, factor de capacidad (k), factor de co-

la (T) y número de platos teóricos (N) para el ketoprofeno, se muestran en la Tabla II.

Tabla II

Resultados de los valores de factor de cola (T), factor de capacidad (k'), y número de platos teóricos (N), promedios y desviación estándar relativa (N=5) del estándar de ketoprofeno a la concentración del 100%

Inyección	Área	Tiempo de retención (min)	T	k'	N
1	4204942	3,285	1,258	2,285	2656
2	4235094	3,287	1,260	2,287	2584
3	4240173	3,286	1,263	2,286	2586
4	4263998	3,278	1,260	2,278	2567
5	4299604	3,293	1,258	2,293	2579
Promedio	4248762	3,286	1,260	2,286	2594
D.E.	35347	0,006	0,002	0,006	35
D.E.R.	0,8	0,2	0,2	0,2	1,4

D.E. = Desviación estándar, D.E.R. = Desviación estándar relativa

Estos resultados demuestran que el sistema cromatográfico cumple con los criterios establecidos en la USP (2012).

LINEALIDAD Y RANGO

La curva de calibración obtenida en el estudio de la linealidad para un rango de concentraciones entre 40% y 140% es presentada en la Figura 3.

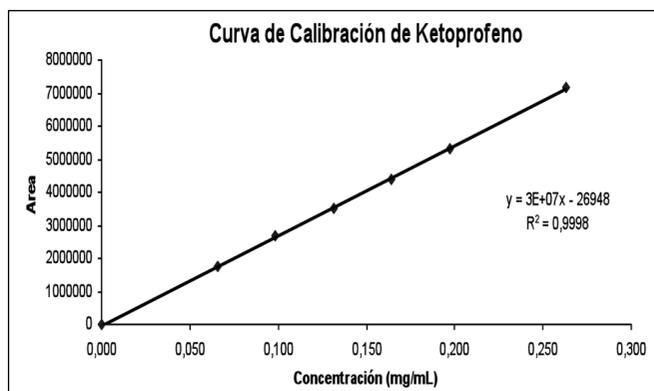


Figura 3. Curva de calibración para patrones de ketoprofeno en un rango de concentración de 40% a 140%.

El criterio de aceptación indica que el coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0,999. Los resultados obtenidos indican que el método es lineal, ya que el coeficiente de correlación obtenido fue 0,9998.

PRECISIÓN

PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del sistema, fue determinada sobre 6 replicas del patrón a la concentración de 100% (0,016 mg/mL). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III.

Tabla III

Estudio de la precisión del sistema de ketoprofeno a la concentración del 100%

Inyección	Tiempo de retención (min)	Área
1	3,285	4204942
2	3,287	4235094
3	3,286	4240173
4	3,278	4263998
5	3,293	4299604
Promedio	3,286	4248762
D.E.	0,006	35347
D.E.R.	0,200	0,8

D.E. = Desviación estándar, D.E.R. = Desviación estándar relativa

Los valores de desviación estándar relativa, tanto para el tiempo de retención como para el área son inferiores al 2%, lo cual demuestra que el método cumple con los criterios establecidos en la USP (2012) para la precisión del sistema.

REPETIBILIDAD

Los resultados para evaluar la repetibilidad del método analítico basado en la variación de la concentración de ketoprofeno se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV

Repetibilidad del método analítico para el ketoprofeno

Prueba	Contenido de Ketoprofeno (mg/tab)	Promedio (mg/tab)	D.E.	DER
I	97,6	97,4	0,2	0,2
	97,2			
	94,0	94,5	0,6	0,7
	94,9			
II	95,6	95,0	0,9	0,9
	94,4			
	95,3	95,0	0,4	0,5
	94,7			
III	95,4	95,5	0,2	0,2
	95,6			
	96,0	96,4	0,6	0,6
	96,8			

D.E. = Desviación estándar, D.E.R. = Desviación estándar relativa

El promedio de las seis muestras fue de 95,6 mg/tab y su coeficiente de variación fue igual a 1,2%. Los resultados muestran la repetibilidad del método

analítico, ya que el valor de coeficiente de variación fue menor a 2%.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Los resultados para evaluar la precisión intermedia del método analítico basado en la variación de la concentración de ketoprofeno se muestran en la Tabla V.

Tabla V

Precisión intermedia método analítico para el ketoprofeno

Analista	Contenido de ketoprofeno (mg/tab)
1	94,6
2	91,7
3	90,2
4	93,0
5	98,2
6	96,0
Promedio	94,0
D.E.	2,9
D.E.R.	3,1

D.E. = Desviación estándar, D.E.R. = Desviación estándar relativa.

El promedio de los seis resultados fue de 94,0 mg/tab y su coeficiente de variación fue igual a 3,1%. El criterio de aceptación para la precisión se puede hacer en base a coeficiente de variación de Horwitz (Horwitz, 1982):

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

Donde: C = valor nominal del analito expresado en potencia de 10.

El coeficiente de variación para una muestra de concentración mayor o igual a 0,1 mg/mL es igual a 3,7%. Los resultados obtenidos muestran que el método es preciso.

ESPECIFICIDAD**PUREZA DE PICO CROMATOGRÁFICO**

Los ángulos de pureza (PA) obtenidos para los picos de patrón y muestra de ketoprofeno son presentados en la Figura 4, en ella se observa que no existen diferencias espectrales significativas, ya que todos los ángulos de pureza son menores que el ángulo del umbral, este hecho indica que el pico estudiado corresponde al ketoprofeno.

Los resultados de estudio de pureza de pico para patrón y muestra control se utilizaron como referencia en la interpretación los gráficos de pureza de pico obtenidos en las pruebas de degradación forzada.

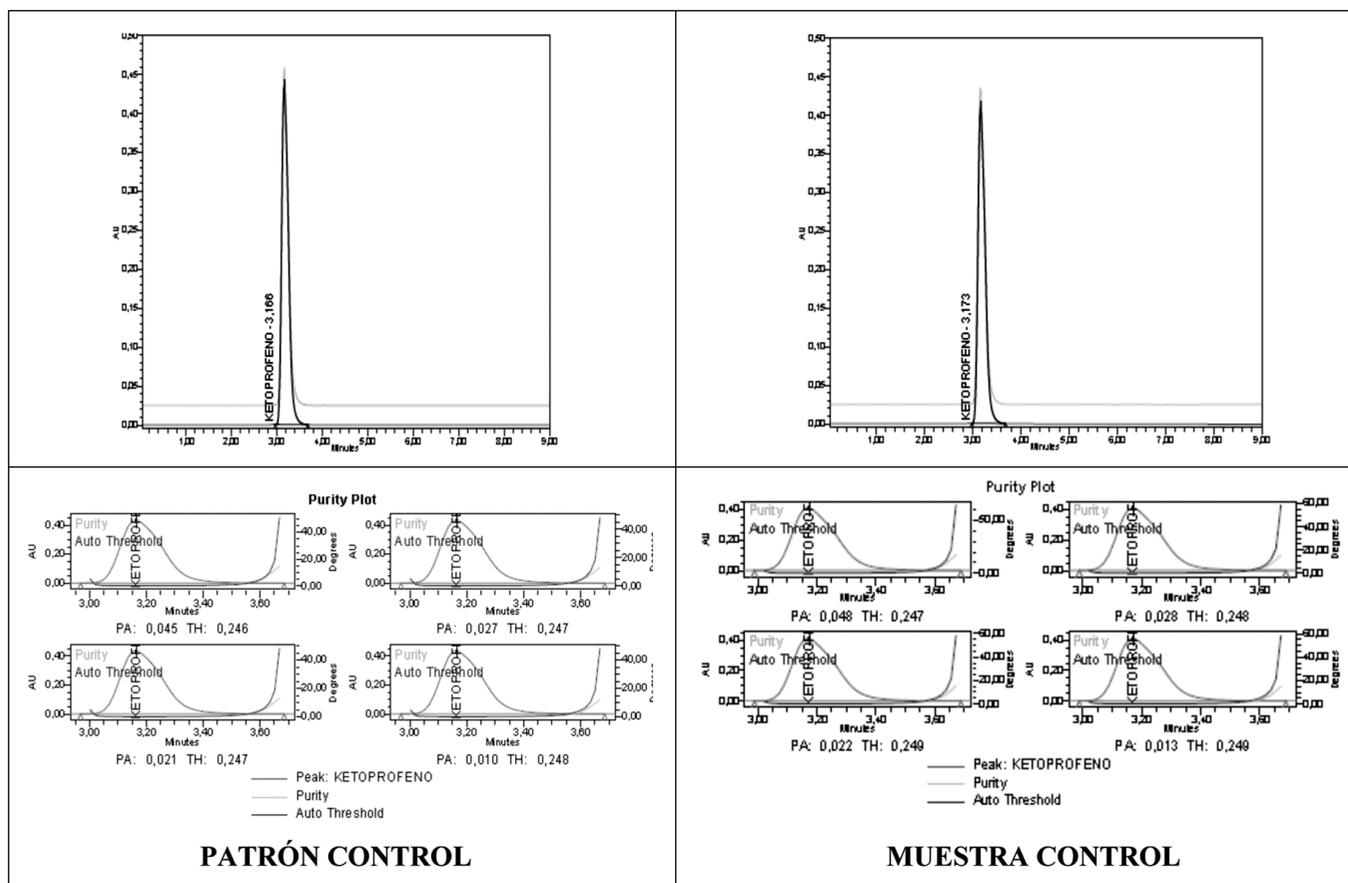


Figura 4. Cromatogramas y gráficos de pureza del pico de patrón y muestra control de ketoprofeno para el estudio de la especificidad.

DEGRADACIÓN FORZADA

En la Figura 5 se presentan los cromatogramas y en la Tabla VI los ángulos de pureza (PA) y ángulo del umbral (TH) correspondientes a las muestras sometidas a las pruebas de degradación forzada realizadas. Se estudiaron todos los cromatogramas obtenidos luego de las pruebas de degradación forzada, en ellos no se observa la presencia de picos cromatográficos adicionales al ketoprofeno, exceptuando el caso de la muestra sometida a oxidación con peróxido de hidrógeno. Dicho cromatograma presenta un pico cromatográfico correspondiente a ketoprofeno, el cual aparece en 3,17 minutos, dicha señal ha disminuido de tamaño con respecto a la de la muestra control (Figura 4). Adicionalmente se observa la aparición de un pico cromatográfico desconocido en 2,0 minutos. Al estudiar el ángulo de pureza del pico cromatográfico de ketoprofeno en la primera fase, observamos que el único caso donde se refleja una diferencia espectral es en la oxidación con peróxido de hidrógeno, ya que el valor de PA = 0,280 es mayor que TH = 0,268. Este hecho podría atribuirse a la presencia de un producto de degradación, el cual esté coeluyendo con el analito.

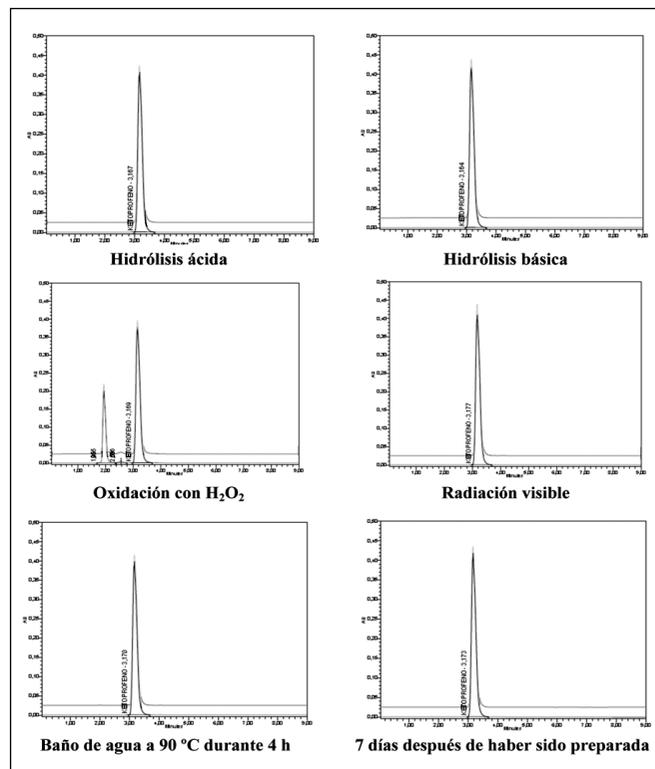


Figura 5. Cromatogramas correspondientes a las muestras de ketoprofeno en tabletas sometidas a las diferentes pruebas de degradación forzada.

Tabla VI
Resultados del análisis de pureza del pico cromatográfico en las pruebas de degradación forzada

Condición de estrés	PA	TH
Hidrólisis ácida	0,153	0,242
Hidrólisis básica	0,145	0,242
Oxidación con peróxido de hidrógeno	0,280	0,268
Radiación visible por 7 días	0,048	0,241
90 ° C durante 4 horas	0,157	0,241
7 días después de ser preparada	0,048	0,247

Nota: los valores sombreados indican donde PA > TH. PA = Ángulos de pureza. TH = ángulo del umbral

Finalmente, se cuantificó la cantidad de ketoprofeno en las muestras estudiadas, los resultados indicaron que la muestra sometida a oxidación con peróxido de hidrógeno sufrió una disminución en cuanto a la cantidad de ketoprofeno, mientras que el resto de las muestras presentaron valores muy cercanos al de la muestra control (Tabla VII). Todos estos resultados nos indican que las tabletas de ketoprofeno son estables frente a las condiciones de degradación forzada aplicadas, exceptuando la oxidación con peróxido de hidrógeno, donde se observó una disminución en la intensidad de la señal cromatográfica, diferencias espectrales en la primera fase y una disminución de la cantidad de ketoprofeno encontrada con respecto a la muestra control.

Tabla VII

Contenido de ketoprofeno encontrado en las muestras sometidas a degradación forzada

Condición de estrés	Contenido de ketoprofeno ± 0,1 (mg/tab)
Muestra control	101,2
Hidrólisis ácida	99,7
Hidrólisis básica	101,9
Oxidación con peróxido de hidrógeno	92,8
Radiación visible por 7 días	102,0
90 ° C durante 4 horas	97,4
7 días después de ser preparada	99,8

Estas pruebas demuestran que el método propuesto es específico para la cuantificación de ketoprofeno y adicionalmente puede ser utilizado como un indicador de estabilidad.

EXACTITUD

Los resultados del estudio de la exactitud son presentados en la Tabla VIII, podemos observar que el procedimiento en estudio es exacto, ya que los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran

dentro del rango establecido para cada uno de los niveles (75%, 100% y 125%). El criterio que permite señalar que un método analítico es exacto indica que el promedio del porcentaje recuperado debe estar dentro del rango de 98% a 102% y la desviación estándar relativa debe ser menor o igual a 2,5% (Lister, 2005).

Tabla VIII

Valores de exactitud del método expresado como porcentajes de recuperación y desviación estándar relativa de la muestra de ketoprofeno a tres concentraciones, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas

%	Muestra	% recuperación	Promedio	D.E.R
75	1-1	98,6	98,6	2,3
	1-2	96,3		
	1-3	100,9		
100	2-1	100,9	99,1	2,5
	2-1	96,3		
	2-3	100,1		
125	3-1	99,3	98,8	3,2
	3-2	95,4		
	3-3	101,6		

Al aplicar la prueba de t, se observa que el valor de t observado ($t_{ob} = 1,479$) ($\alpha = 0,05$ v = 8) es menor que el encontrado en las tablas (2,306). Este resultado confirma que el método es exacto.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación para el ketoprofeno se calcularon estadísticamente a partir de los datos de regresión lineal y la desviación estándar de la respuesta (Miller y Miller, 2002), obteniéndose valores de 0,0533 mg/mL y 0,1778 mg/mL, respectivamente.

Conclusiones

Se optimizó y validó una metodología analítica para la determinación de ketoprofeno en comprimidos con cubierta entérica bajo las siguientes condiciones: una columna C18 de 300 x 3,9 mm, 10 μ m y una fase móvil de acetonitrilo: agua: buffer fosfato pH = 3,5 (58:40:2), longitud de onda de máxima absorción 255 nm, un volumen de inyección de 1,5 mL/min. La evaluación de la precisión del sistema, repetibilidad y precisión del método demostraron que el método es preciso. El método es lineal en el rango comprendido entre 0,064 y 0,224 mg/mL. El valor del coeficiente de correlación obtenido es igual a 0,9998. Las pruebas de degradación forzada demostraron que el método es específico para la cuantificación de ketoprofeno. El uso del detector de diodos permitió realizar

el análisis de pureza de pico en las pruebas de degradación forzada, en ellas se encontraron diferencias espectrales en la primera fase para la muestra sometida a la exposición con peróxido de hidrógeno, estas diferencias pueden atribuirse a la presencia de productos de degradación. Esto indica que el método puede ser utilizado para la determinación del contenido de ketoprofeno y en pruebas de indicadores de estabilidad.

Referencias bibliográficas

Bempong DK, Bhattacharyya L. 2005. Development and validation of a stability indicating high-performance liquid chromatographic assay for ketoprofen topical penetrating gel. *J Chromatogr A* 1073: 341-346.

Dvorák J, Hájková R, Matysová L, Nováková L, Koupparis MA, Solich P. 2004. Simultaneous HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals. *J Pharmaceut Biomed* 36: 625-629.

Horwitz W. 1982. Evaluation of analytical method used for regulation of food and drugs. *Anal Chem* 54: 67-76.

Lister A. Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. In: *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Eds: Ahuja S, Dong MW. Academic Press, Elsevier: London, UK, 2005. pp. 191-217

Miller JN, Miller JC. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4ta ed. Prentice Hall: Madrid, España, 2002.

Quattrocchi O, Abelaira S, Laba F. *Introducción a la HPLC*. Artes gráficas Farro: Buenos Aires, 1992.

United States Pharmacopeia (USP) 36. *The United States Pharmacopeia Convention*; USA, 2012.