


Análisis cromatográfico para presentaciones de analgésicos en combinaciones de dosis fijas con paracetamol

Hurtado Y de la Peña Marcela*, Medina López José Raúl, Alarcón Angeles Georgina

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100 colonia Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán Ciudad de México C.P. 04960. México.

*Autor para correspondencia: mhurtado@correo.xoc.uam.mx

ORCID : 0000-0003-3546-5986

Recibido:

07/junio/2022

Aceptado:

30/diciembre/2022

Palabras clave:

gradientes de elución,
AINEs,
paracetamol

Keywords:

elution gradient,
NAIDs,
acetaminophen

RESUMEN

Se desarrollaron cuatro sistemas cromatográficos ternarios en gradiente para el análisis cuantitativo de diferentes mezclas de analgésicos/antiinflamatorios que suelen combinarse en formas dosificación para potenciar sus efectos. El objetivo de los métodos desarrollados fue lograr la resolución en un tiempo de análisis corto y con características cromatográficas adecuadas. Los sistemas de gradiente requieren estabilizarse en los cambios de condición, prolongando el tiempo de corrida. Las propuestas que aquí se presentan es en columnas de 50 X 4.6 mm C8 y C18 con tamaño de partícula 2.6 y 5 micrometros respectivamente. Como fases móviles: diferentes combinaciones de agua, solución ácida y metanol: acetonitrilo. La detección mediante detector UV, se ajustó a una longitud de onda adecuada al analgésico a determinar. Las condiciones propuestas permiten corridas de gradiente en máximo 10 minutos y con características cromatográficas aceptables.

ABSTRACT

Four ternary chromatographic systems in gradient were developed for the quantitative analysis of different analgesic/anti-inflammatory mixes, which are usually combined in a dosage form to potentialize their effects. The objective of the developed methods was to achieve a resolution in a shorter time and with adequate chromatographic characteristics. The gradient systems, need to stabilize in the condition changes as to modify the mobile phase during the analytic run, since the time of analysis is longer. The proposals here presented are in columns of 50x4.6 mm C8 and C18, with particles sizes of 2.6 and 5 micrometers accordingly. As mobile phases: different combinations of water, acid solution and methanol: acetonitrile. The detection by UV detector was adjusted to the wavelength of each analgesic to be determined. The proposed conditions allow the gradient analytic runs to be done in maximum 10 minutes time, with acceptable chromatographic characteristic peaks.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (WHO), el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Sociedad Americana del Dolor (APS), tienen lineamientos comunes para el manejo del dolor. Su recomendación fundamental es el alivio del dolor, para lograr ese objetivo, como primer paso el tratamiento de elección es la terapia con analgésicos no narcóticos de primera línea bien tolerados, antes de pasar a un analgésico de tipo narcótico, si los primeros no han dado un buen resultado se sugiere una combinación de analgésicos no narcóticos con diferente sitio de acción. El paracetamol y los derivados del ácido aril-propiónico tienen diferente mecanismo de acción, mientras éstos últimos tienen acción periférica, el paracetamol tiene acción al nivel central y su combinación ha demostrado eficacia en estudios preclínicos y clínicos (Miranda et al., 2006). Aunado a la ventaja de poder disminuir las dosis de los fármacos, lo cual conlleva a una disminución en los efectos secundarios (Altman, 2004).

Por lo que un régimen cuidadosamente diseñado combinando los analgésicos orales correctos en las dosis adecuadas para pacientes sufriendo dolor de leve a moderado, significa beneficios en alivio y disminución de efectos no deseados. La combinación de paracetamol con diferentes analgésicos/antinflamatorios se ha convertido en una estrategia terapéutica para maximizar los beneficios en la farmacoterapia del dolor.

De lo anterior resulta frecuente encontrar combinaciones de dosis fija de paracetamol como: 325 mg de paracetamol con 200 mg ibuprofeno, 300 mg de paracetamol con 275 mg y naproxeno, y 300 mg de paracetamol con 100 mg ketoprofeno en diferentes productos genéricos.

La combinación de paracetamol y cafeína es frecuente ya que dicha combinación resulta 40% más efectiva en su efecto analgésico que el paracetamol sólo. (Shariq et al., 2005). Dadas estas combinaciones es necesario, el desarrollo de métodos analíticos confiables para la determinación cuantitativa de los principios activos en estos productos y los métodos útiles para sus respectivos estudios de disolución.

Existe una gran cantidad de métodos cromatográficos en fase reversa reportados para la determinación de analgésicos/antinflamatorios de manera independiente (Whelan et al., 2005, Kučera et al., 2005) paracetamol (McEvoy et al., 2007) y en diferentes combinaciones (Sanchaniya et al., 2013). Las combinaciones frecuentemente recurren al desarrollo de gradientes de elución (Vanovaa et al., 2022, Encarnaçao et al., 2020).

En el caso de los derivados del ácido aril-propiónico, por tratarse de fármacos con carácter ácido (pKas entre 4 y 5.5) el pH de la fase móvil suele ajustarse alrededor 3, buscando una mejor retención de los analitos en fase reversa, el pKa del paracetamol es de 9.5 permite que su retención sea adecuada igualmente a este pH, sin embargo, los valores de log P de los derivados del ácido aril-propiónico se encuentran entre 3 y 4 el log P del paracetamol es de 0.9. Se puede predecir que en un sistema isocrático de fase reversa, los factores de retención de los compuestos de las mezclas presentaran valores muy distintos, prolongando tiempos de corrida y causando parámetros cromatográficos poco aceptables para los picos más retenidos. Una estrategia analítica común para este tipo de mezclas es el diseño de un sistema cromatográfico de gradiente (Polo, 2015, Nováková et al, 2006, Milenković et al, 2021). En el caso de la cafeína y el paracetamol, la cafeína es un compuesto con carácter débilmente básico por lo que su retención no se ve favorecida a pH ácido y dadas las características del paracetamol no resulta afectado por el pH de la fase móvil. La mezcla paracetamol/cafeína se resuelve en función de la diferencia de afinidades por la fase estacionaria y la modificación de la fuerza de elución de la fase móvil.

La modificación de la fuerza de elución de la fase móvil durante la corrida analítica teóricamente es bastante atractiva para mejorar los resultados cromatográficos, sin embargo, es importante considerar, que los cambios en la fase móvil se deben estabilizar para lograr resultados reproducibles, esto prolonga el tiempo de corrida analítica, lo cual constituye un inconveniente para los métodos de gradiente. En este trabajo se proponen una serie de métodos por cromatografía de líquidos de alta presión en sistemas ternarios de gradiente para el análisis de estas combinaciones, en columnas de 50 x 4.6 mm, con fases estacionarias de fase reversa de C8 y C18 con tiempos de corrida máximos de 10 minutos.

Metodología

Equipos

Se utilizaron dos sistemas cromatográficos:

- 1) Cromatógrafo marca Agilent modelo 1260, equipado con una bomba cuaternaria, auto-muestreador, horno y un detector de arreglo de diodos. (Métodos: Paracetamol/derivados del ácido aril-propiónico).
- 2) Cromatógrafos Varían ProStar equipado con una bomba ternaria, un detector de UV de longitud de onda variable, y auto-muestreador. (Método: Paracetamol/cafeína).

Tabla 1. Condiciones de elución y detección (A: Agua, B: acetonitrilo. C: metanol, D: (ácido fosfórico 0.04%).

Fármaco combinado con Paracetamol	minutos	A	D	B	C	Longitud de onda de detección
Ketoprofeno	0	0	80	5	15	250 nm
	1.5	0	80	5	15	
	2.5	0	40	40	20	
	3.5	0	40	40	20	
	7	0	80	5	15	
Ibuprofeno	0	0	85	5	10	220 nm
	1.5	0	85	5	10	
	2.5	0	20	55	25	
	6.0	0	20	55	25	
	8.0	0	85	5	10	
Naproxeno	0	0	85	5	10	250 nm
	1.5	0	85	5	10	
	2.5	0	25	45	30	
	6.0	0	25	45	30	
	8.0	0	85	5	10	
Cafeína	0	80	0	0	20	273 nm
	3	80	0	0	20	
	4	65	0	20	15	
	5	50	0	40	10	
	6	35	0	60	5	
	9	35	0	60	5	
	10	80	0	0	20	

Tabla 2. Tratamiento de muestras farmacéuticas.

Combinado en dosis fija	Peso de muestra	Solvente de dilución/aforo	Dilución final/solvente	Intervalo de trabajo
Paracetamol/ketoprofeno 300/100	Equiv. A 1 tableta	Metanol/ 100 ml (sonicar y filtrar)	3 ml /50 ml de H ₃ PO ₄ 0.04%	Paracetamol 0.05-0.3 mg/ml) Ketoprofeno (0.04-0.1 mg/ml)
Paracetamol/Ibuprofeno 325/200	Equiv. A una tableta	NaOH 0.1 N con 50% v/v de Metanol 100 ml (sonicar y filtrar)	0.7 ml/ 10 ml en H ₃ PO ₄ 0.04% + 1 ml de ketoprofeno conc. 2 mg/ml	Paracetamol (0.144-0.3 mg/ml) Ibuprofeno (0.08-0.18 mg/ml)
Paracetamol/Naproxeno 300/275	Equiv. A 200 mg de Naproxen	NaOH 0.05 N con 50% v/v de Metanol 100 ml (sonicar y filtrar)	0.2 ml/10 ml en H ₃ PO ₄ 0.04% + 1 ml de metanol.	Paracetamol (0.02-0.06 mg/ml) Naproxen (0.02-0.06 mg/ml) .
Paracetamol/cafeína 500/50	Equiv. a una tableta	Metanol/ 100 ml Sonicar y filtrar	0.3 ml/10 ml en metanol:agua 20:80	Paracetamol (0.1-0.2 mg/ml) Cafeína 0.01-(0.02 mg/ml)

Condiciones cromatográficas

Para las combinaciones paracetamol/derivados de ácido aril-propiónico se utilizó una columna ThermoScientific Accucore C8 de 4.6x50 mm y 2.6 micrómetros de tamaño de partícula. La separación Paracetamol/cafeína en una columna allsphere C18 de 50X4.6 mm de 5 micrómetros de tamaño de partícula.

Como fase móvil se establecieron diferentes gradientes (tabla 1) de acuerdo a la combinación de fármacos, utilizando en la línea A agua grado HPLC, línea D ácido fosfórico 0.04% v/v, en la línea B acetonitrilo y en la línea C metanol a un flujo de 1 ml por minuto y manteniendo el horno de la columna a 40°C. La longitud de onda fue también un parámetro ajustado de acuerdo con el fármaco combinado con el paracetamol.

El tratamiento de los productos farmacéuticos se adaptó a cada combinación para favorecer la mejor recuperación de los principios activos, en la tabla 2 se resumen los diferentes tratamientos, que se realizaron a cada una de las formulaciones de combinación en dosis fija.

Validación del sistema para cada combinación

Se validó el sistema cromatográfico mediante la realización de 5 réplicas de curvas de calibración para determinar la linealidad y precisión del sistema analítico en las condiciones seleccionadas para todas las combinaciones.

Validación de los métodos analíticos

Se evaluó la precisión y la precisión intermedia (Inter día) del método en 6 réplicas y se aplicó el método en diferentes marcas de productos farmacéuticos con las mezclas referidas.

Resultados y discusión

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos para las cuatro combinaciones probadas, en los cuales se observan corridas con tiempos de retención menores a 10 minutos.

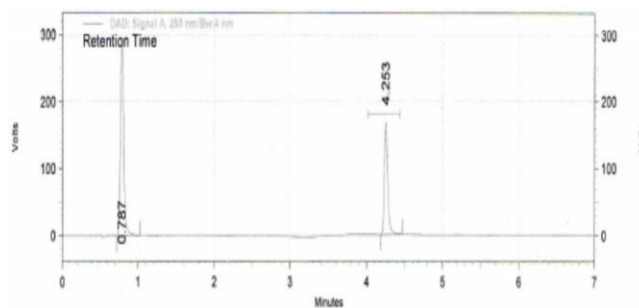


Figura 1. Combinación paracetamol (0.787')/ketoprofeno (4.253').

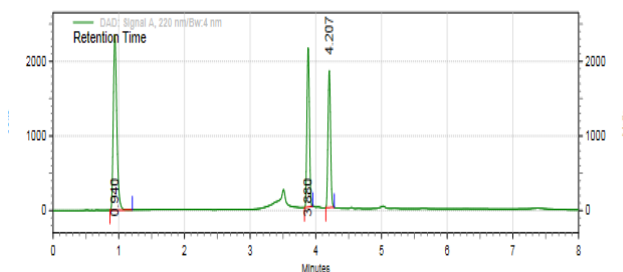


Figura 2. Combinación Paracetamol (0.940')/ibuprofeno (4.20'), ketoprofeno (3.88').

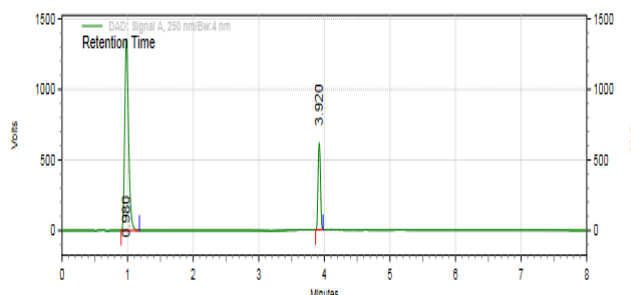


Figura 3. Combinación Paracetamol (0.980')/Naproxeno (3.92').

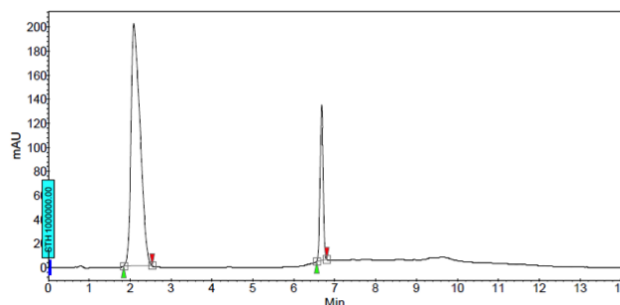


Figura 4. Combinación paracetamol (2.32')/cafeína (6.79').

Tabla 3. Resultados de validación de los métodos (CV: Coeficiente de variación, FR: Factor respuesta).

Medicamento en combinación de dosis fija	Tiempo de retención	Parámetros del sistema		Parámetros del método	
		R ²	%CV (FR) n=5	% Prom. de recobro	%CV (n=6)
Paracetamol/Ketoprofeno 300 mg/100 mg	0.79'/4.25'	0.999/0.990	1.2/3.9	104.7/101.6	1.64/2.23
Paracetamol/Ibuprofeno 325 mg/200 mg	0.9'/4.1'	0.998/0.996	1.3/4.0	101.0/107.5	1.2/3.2
Paracetamol/Naproxeno 300 mg/275 mg	0.98'/3.94'	0.999/0.992	2.8/3.7	104.4/100.0	2.07/2.3
Paracetamol/cafeína 500 mg/50 mg	2.32'/6.79'	0.99/0.99	2.4/4.0	98.8/98.7	2.02/1.9

La tabla 3 de resultados de validación muestra linealidades y repetibilidad aceptables para el sistema en todos los casos. El tratamiento de muestras farmacéuticas permitió recobros promedios de principio activo dentro de especificaciones farmacéuticas para contenido (90-110%) y coeficientes de variación aceptables para precisión intermedia (3%). El tratamiento de las muestras es relativamente sencillo como se observa en la tabla 2 que resume este aspecto. La duración de los gradientes cromatográficos no va más allá de 10 minutos, la resolución y simetría de picos observadas en las figuras 1,2,3 y 4 son adecuadas para la cuantificación. El gradiente más largo corresponde a la mezcla paracetamol/cafeína, la razón radica en el sistema cromatográfico convencional utilizado en este desarrollo, (presión máxima 400 bar, con tamaño de partícula de 5 micrómetros en el empaque de la columna) (Milenković et al., 2021), sin embargo, se logró un tiempo de corrida máximo de 10 minutos dada la corta longitud de 50 mm de la columna. Los métodos desarrollados han sido utilizados con éxito para la cuantificación de productos y para muestras provenientes de estudios de disolución. Es importante señalar que, en los casos de muestras de disolución, dado el carácter ionizable de varias de las moléculas, es importante revisar el estado de ionización del analito. Las muestras de disolución realizadas en soluciones amortiguadoras a pH neutro a básico deben ser ajustadas antes de inyectar al cromatógrafo, por el riesgo de una mezcla de estado ionizado/no ionizado, con una fase móvil de pH ácido.

Conclusiones

Los métodos en sistemas de gradiente de mezclas ternarias desarrollados presentan parámetros cromatográficos aceptables, cumplen con criterios de validación, con un tratamiento sencillo de la muestra y una corrida analítica no mayor a 10 minutos.

Agradecimientos

A la Q.F.B. Yéssica Paola Torres Morales, a la Q.F.B. Claudia Alejandra García Zúñiga y al Q.F.B. Esteban Rodríguez Gallegos por el apoyo en el desarrollo experimental del proyecto.

Referencias

- Altman R, D. (2004) A rationale for combining acetaminophen and NSAIDs for mild-to moderate pain. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 22, 110-117.
- Encarnação T*, Aguiar A., Palito C., País A.A.C.C., Campos M.G., Sobral A.F.N., HughD. Burrows H.D. (2020). Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous analysis of paracetamol, ibuprofen, olanzapine, and simvastatin during microalgae bioremediation. *MethodsX* 7,1-12.
- Kučera J., Sochor J., Klimes J., Dohnal. (2005). Use of the zirconia-based stationary phase for separation of ibuprofen and its impurities. *Journal Pharmaceutical and Biomedical analysis* 38, 609-618.

- McEvoy E., Donegan S., Power J., Altrial K. (2007). Optimisation and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44,137-143.
- Milenković M., Rašević M., Otašević B., Zečević M., Malenović A., Protić A.. (2021). Generic approach in a gradient elution HPLC method development that enables troubleshooting free method transfer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* ,207,1-13.
- Miranda H.F., Puig M. M., Prieto J.C., Pinardi G.,(2006). Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain*, 121,22-28.
- Nováková L., Matysov' a L., Solich P.,(2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 68, 908-918.
- Polo Diez L.M. (2015) *Fundamentos de Cromatografía*. 1º Ed. Dextra,Editorial S.L. p 264-295.
- Sanchaniya P.M., Mehta F.A., Uchadadiya N.B. (2013). Development and Validation of an RP-HPLC Method for Estimation of Chlorpheniramine Maleate, Ibuprofen, and Phenylephrine Hydrochloride in Combined Pharmaceutical Dosage Form. *Chromatography Research International* 12/14, 1-13.
- Shariq A. S.,Kamimori S.G., Kelly W.,Natalie D. Eddington N.D,(2005). Multiple dose pharmacokinetics of caffeine administered in chewing gum to normal healthy volunteers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*,26, 403-409.
- Vanovaa J., Malinak D., Andrys R., Kubat M. , Mikyseka T., Erika Rousarova E., Musilek K., Rousar T., Ceslaa P. (2022).Optimization of gradient reversed phase high performance liquid chromatography analysis of acetaminophen oxidation metabolites using linear and non-linear retention model. *Journal of Chromatography A* 1669, 1-13.
- Whelan M.R, Ford J.L.,Powell M.W., (2005). Simultaneous determination of ibuprofen and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) using HPLC and evaporative light scattering detection. *Journal Pharmaceutical and Biomedical analysis* 30,1355-1359.