

Validación de un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el clorhidrato de papaverina

Autores: Caridad Margarita García Peña*¹, Karine Elena Rodríguez Fernández², Vivian Martínez Espinosa³, Claudia Mora Rojas⁴, Susana Gómez Martínez⁵, Zenia Caridad Pardo Santos⁶, Nadieska Castrillón Vilaboy⁷

¹Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Tecnólogo de primer nivel. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). correo electrónico: caridad.garcia@cidem.cu

²Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). correo electrónico: karine.rodriquez@cidem.cu

³Técnico medio. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). correo electrónico: vivian.martinez@cidem.cu

⁴Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). correo electrónico: claudia.mora@cidem.cu

⁵Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Empresa Laboratorio Farmacéutico 8 de Marzo. correo electrónico: caridad.garcia@cidem.cu

⁶Master en Bioseguridad. UEB Laboratorios Eduardo Reyes Canto. correo electrónico: caridad.garcia@cidem.cu

⁷Licenciada en Bioquímica. UEB Laboratorios Eduardo Reyes Canto. correo electrónico: caridad.garcia@cidem.cu

*Autor de correspondencia: DraC. Caridad Margarita García Peña. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave 26 No. 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes. Plaza de la Revolución. La Habana. Cuba. e-mail: caridadgp@infomed.sld.cu; caridad.garcia@cidem.cu

RESUMEN

Introducción: El clorhidrato de papaverina es un alcaloide obtenido de forma natural a partir del opio proveniente del *Papaver somniferum*. Su principal efecto farmacológico consiste en la relajación no específica del músculo liso, razón por la cual es empleado como vasodilatador para el tratamiento de patologías como disfunción eréctil y espasmos musculares, entre otras.

Objetivos: Desarrollar y validar un método analítico por CLAR, para aplicarlo en el control de la calidad y estudio de estabilidad del clorhidrato de papaverina.

Métodos: En el estudio de validación del método se evaluaron los parámetros especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación; con el objetivo de aplicarlo al control de calidad del clorhidrato de papaverina en forma de Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA), y al control de calidad y estudio de estabilidad del producto terminado denominado clorhidrato de papaverina-100 inyectable. Además se realizó el estudio de comparación estadística entre el método desarrollado y el método espectrofotométrico establecido en la empresa productora para el producto terminado, empleando el estadígrafo t-student.

Resultados: Los resultados obtenidos en las validaciones realizadas se encontraron dentro de los límites establecidos para los estudios de validación. No se evidenciaron diferencias significativas entre los métodos analíticos evaluados ya que el valor de t calculado fue menor que el tabulado.

Conclusiones: Se demostró la confiabilidad del método por CLAR, tanto para el IFA como para el producto terminado. Se comprobó que el resultado obtenido por el método desarrollado y validado por CLAR y el método espectrofotométrico establecido en la empresa productora de clorhidrato de papaverina-100 inyectable, no se diferenciaban de manera significativa.

Palabras claves: clorhidrato de papaverina, cromatografía líquida de alta resolución, validación.

Validation of an analytical method by High Performance Liquid Chromatography for papaverine hydrochloride

ABSTRACT

Introduction: Papaverine hydrochloride is an alkaloid obtained naturally from opium from *Papaver somniferum*. Its main pharmacological effect is the non-specific relaxation of smooth muscle, which is why it is used as a vasodilator for the treatment of pathologies such as erectile dysfunction and muscle spasms, among others.

Objectives: To develop and validate an analytical method by CLAR, to apply it in quality control and stability study of papaverine hydrochloride.

Methods: In the method validation study, the parameters specificity, linearity, accuracy, precision, detection limit and quantification limit were evaluated; with the objective of applying it to the quality control of papaverine hydrochloride in the form of an Active Pharmaceutical Ingredient (IFA), and to the quality control and stability study of the finished product called injectable papaverine-100 hydrochloride. In addition, a statistical comparison study was carried out between the method developed and the spectrophotometric method established in the producing company for the finished product, using the t-student statistic.

Results: The results obtained in the validations performed were within the limits established for the validation studies. There were no significant differences between the analytical methods evaluated since the value of t calculated was lower than the tabulated one.

Conclusions: The reliability of the CLAR method was demonstrated, both for the IFA and for the finished product. It was found that the result obtained by the method developed and validated by CLAR and the spectrophotometric method established in the company producing injectable papaverine hydrochloride-100, did not differ significantly.

Keywords: papaverine hydrochloride, high resolution liquid chromatography, validation

INTRODUCCIÓN

Las plantas son responsables de sintetizar compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en ellas denominados metabolitos secundarios, los cuales intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Dichos metabolitos poseen un valor comercial y son empleados en la industria farmacéutica por sus propiedades farmacológicas (1).

Uno de los tipos de metabolitos secundarios sintetizados a partir de aminoácidos son los alcaloides. Estos se clasifican en diversos grupos que incluyen a los alcaloides de tipo bencilisoquinolinas, comúnmente usados con propósitos medicinales. El opio, polvo obtenido de las cápsulas de las semillas verdes de la planta adormidera (*Papaver somniferum*), se considera actualmente como la única fuente natural de diversas bencilisoquinolinas tales como el vasodilatador clorhidrato de papaverina y el potente agente anticancerígeno noscapina ambos de alto valor e importancia a nivel farmacéutico (2).

El clorhidrato de papaverina, en forma de clorhidrato, es también empleado como un relajante de la musculatura lisa en casos de disfunción eréctil, tratamientos de espasmos en el tracto intestinal y urinario, migrañas, etc. Todos los usos de este alcaloide son atribuidos a los efectos inhibitorios que produce sobre las fosfodiesterasas que incrementan los niveles de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) (2, 3).

El clorhidrato de papaverina puede ser encontrado en forma de tabletas e inyectables fundamentalmente. Las preparaciones inyectables son soluciones, emulsiones o suspensiones estériles. Están preparadas de manera que permiten la disolución, emulsión o la dispersión de los principios activos y eventualmente, de las sustancias auxiliares añadidas en agua para preparación inyectable, en un líquido no acuoso apropiado o en una mezcla de estos dos vehículos. Pueden ser clasificadas en unidosis o multidosis (4).

El clorhidrato de papaverina- 100 inyectable, es una solución estéril producida en nuestro país en la Unidad Empresarial de Base (UEB) Eduardo Reyes Canto perteneciente a Empresa AICA, en la provincia La Habana. Dicho producto se comercializa en forma de estuche con 100 ampollitas de vidrio de tipo incoloro o transparente. Cada ampollita presenta una capacidad de 2 mL.

Según la información que aparece en las revisiones de la literatura científica correspondientes al tema de clorhidrato de papaverina, los métodos analíticos más difundidos tanto para identificar como para

cuantificar dicho analito son los métodos espectrofotométricos (5, 6). En la Farmacopea de los Estados Unidos, 2015, aparece reportada la monografía oficial para clorhidrato de papaverina en el IFA por Volumetría de Neutralización No Acuosa, y en tabletas y preparaciones inyectables por Espectrofotometría UV-VIS. (7)

Sin embargo, a pesar de que el análisis por CLAR se ha encontrado bastante difundido para determinaciones en tabletas que contienen clorhidrato de papaverina como IFA (8, 9) se reportan muy pocos casos de la utilización de este método en inyectables (6). Por tales motivos fue desarrollado un método analítico por CLAR en el departamento de investigaciones analíticas del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).

Los métodos por CLAR, al igual que todos los métodos analíticos desarrollados o reportados en monografías oficiales, requieren ser validados. La validación es el procedimiento científico llevado a cabo mediante estudios en el laboratorio que proporciona la evidencia documental para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación o proceso (10). Es exigida rigurosamente por los órganos rectores nacionales e internacionales. Incluye el análisis estadístico de todos los datos obtenidos durante la ejecución de los estudios de laboratorio, de manera tal que puedan establecerse las variables que proporcionan la información sobre las posibilidades de aplicación del método analítico seleccionado (10, 11).

Los objetivos del presente trabajo consistieron en validar el método analítico por CLAR aplicable al clorhidrato de papaverina IFA y al producto terminado papaverina-100 inyectable; comprobar la aplicabilidad del método para determinar cualitativamente los productos de degradación en muestras testigos de producto terminado de clorhidrato de papaverina; comparar el método analítico desarrollado con el método analítico establecido oficialmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon la sustancia de referencia química de clorhidrato de papaverina, lote No. H11070, de calidad USP y el clorhidrato de papaverina IFA perteneciente al lote 0910213 procedente de la India, del fabricante Deccan Phytochemicals Hyderabad.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, procedentes de la Riedel –de Haen (España).

Método para la cuantificación del IFA aplicable al control de calidad del clorhidrato de papaverina IFA

Para la determinación del IFA, se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, se utilizó un cromatógrafo (KNAUER) con detector UV/VIS (KNAUER) ajustado a 253 nm, un dosificador (Loop) de 10 μ L e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Lichrosorb RP- 18, con tamaño de partícula de 5 μ m (125 x 4 mm). La fase móvil consistió en una mezcla desgasificada de acetonitrilo-solución acuosa 5 mM de ácido 1-heptano sulfónico sal sódica (50:50) posteriormente ajustada a pH = 4 con ácido acético; con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. (7)

La sustancia de referencia química y las muestras fueron preparadas según la metodología que se describe a continuación: se pesaron independientemente, con exactitud, 10 mg de sustancia de referencia química de clorhidrato de papaverina y de IFA, posteriormente se trasvasaron a un matraz aforado de 100 mL al cual se le adicionaron 20 mL de fase móvil; luego se colocó en un baño ultrasónico durante cinco minutos, para disolver la cantidad pesada y finalmente se completó volumen con fase móvil.

En el estudio de validación se evaluaron los siguientes parámetros:

Especificidad

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método se analizó: la sustancia de referencia química de clorhidrato de papaverina; la muestra de IFA y muestras sometidas a condiciones drásticas tales como: medio ácido (HCL 5N), medio básico (NaOH 5N), oxidación (H_2O_2), luz solar y temperatura (40 ± 2 °C). Las muestras de análisis permanecieron degradándose durante 7 días.

Criterios: No se debe obtener señal de los productos de degradación en la zona de elusión del ingrediente activo (7, 11-14).

Linealidad

Para evaluar el parámetro linealidad se prepararon cinco disoluciones de concentraciones conocidas de la sustancia de referencia química, correspondientes al 50, 80, 100, 120, y 150 % de la concentración teórica. Se realizaron tres réplicas para cada una de las cinco disoluciones preparadas.

Criterios: ecuación de la recta ($Y = bX + a$), coeficiente de correlación ($r \geq 0,999$), coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0,980$), desviación estándar relativa de la pendiente: $S_b(\text{rel}) \leq 2,0$ %, coeficiente de variación de los factores de respuesta: $CV_f \leq 5,0$ % (7, 11-14).

Exactitud

En el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, preparando muestras con diferentes niveles de la concentración teórica del principio activo en la solución: bajo, medio y alto correspondiente con el 80, 100 y 120 %, respectivamente.

Criterios: recuperación media entre un 98,0 – 102,0 %, la G calculada debe ser menor que G tabulada, la t calculada debe ser menor que t tabulada, para un nivel de confianza de 95 % (7, 11-14).

Precisión

Se evaluó la precisión del método a través de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se llevó a cabo por un mismo analista, el mismo día y a través del análisis de diez réplicas de la muestra con un solo nivel de concentración correspondiente al 100 %. Se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

El estudio de precisión intermedia se realizó por dos analistas, a un mismo nivel de concentración, y se efectuó el análisis de diez réplicas de muestras homogéneas en el mismo laboratorio.

Criterios: Repetibilidad ($C.V \leq 2,0$). Precisión intermedia (t calculada debe ser menor t tabulada; F calculada debe ser menor F tabulada), para un nivel de confianza de 95 % (7, 11-14).

Límite de detección y cuantificación

La evaluación de los parámetros límite de detección y cuantificación se desarrolló por estimación, a través de rectas de calibrado. Para calcularlos se realizaron determinaciones a tres concentraciones inferiores a las empleadas en la confección de la curva de linealidad, con las cuales se obtuvo una nueva recta de regresión lineal y por tanto una nueva ecuación. A partir de dicha ecuación se determinó la estimación de la respuesta del blanco. Luego se diseñó una curva adicional con las desviaciones estándar de los puntos empleados anteriormente. De esta manera se obtuvo la desviación estándar del blanco que es equivalente al intercepto de la curva resultante (7, 11-14).

Método para la cuantificación del IFA por CLAR para papaverina-100 inyectable

Se realizó la evaluación del desempeño del método en el producto terminado papaverina-100 inyectable, aplicando las condiciones cromatográficas empleadas en el control de la calidad del clorhidrato de papaverina IFA. Se comprobaron los parámetros: especificidad, exactitud y precisión.

Para el presente estudio se empleó como muestra de ensayo, papaverina- 100 inyectable correspondiente al lote 4003 y placebo, elaborados ambos en la UEB Reyes Canto perteneciente Empresa Farmacéutica AICA.

Para la obtención de la muestra correspondiente a la papaverina inyectable primeramente se procedió a preparar una mezcla de producto terminado, empleando para ello diez muestras de papaverina-100 inyectable. De la mezcla se tomaron 2 mL y se trasvasaron a un matraz aforado de 100 mL; posteriormente se adicionaron 20 mL de fase móvil y luego se colocó en un baño ultrasónico durante cinco minutos, al final se enrazó el volumen con fase móvil.

La sustancia de referencia química se preparó a una concentración de 0.1 mg/mL, en fase móvil.

En la evaluación del desempeño del método, se evaluaron los siguientes parámetros:

Especificidad

Para el estudio de especificidad se analizaron: el placebo, la sustancia de referencia y la muestra del producto terminado papaverina-100 inyectable, muestras sometidas a condiciones drásticas tales como: hidrólisis ácida (HCL 5N), hidrólisis básica (NaOH 5N), oxidación (H₂O₂), luz solar y temperatura (40 ± 2 °C). Las muestras de análisis permanecieron degradándose durante 7 días.

Criterios: No se debe obtener señal del placebo, ni de los productos de degradación en la zona de elusión del ingrediente activo (7, 11-14).

Exactitud y precisión

Para evaluar los parámetros de exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia) del método analítico aplicable al producto terminado, se aplicó la metodología reportada para el IFA, con la diferencia que en este caso las muestras eran del producto terminado papaverina -100 inyectable.

Comparación estadística entre el método desarrollado y el método establecido

Para realizar la comparación estadística se emplearon dos métodos: el desarrollado por CLAR en el departamento de investigaciones analíticas del CIDEM; el método establecido y validado en la UEB Reyes Canto para el control de la calidad de papaverina-100 inyectable: Espectrofotometría UV-VIS. Se evaluaron seis réplicas por cada uno.

Para la determinación espectrofotométrica del clorhidrato de papaverina se empleó como blanco ácido clorhídrico 0,1 mol/L las lecturas se realizaron a 251 nm, en un espectrofotómetro (Genesys

10S UV-VIS, Thermo Scientific, Estados Unidos). La sustancia de referencia química y las muestras se prepararon a una concentración de 5 µg/mL, disueltas en ácido clorhídrico 0,1 mol/L.

Con el empleo de ambos métodos se calcularon las medias y las desviaciones correspondientes. Posteriormente se realizó el tratamiento estadístico mediante la prueba t de Student con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos del contenido del clorhidrato de papaverina, por ambos métodos.

Criterio: $t_{\text{calculada}} \leq t_{\text{tabulada}}$

RESULTADOS

Validación del método analítico para la cuantificación del IFA aplicable al control de calidad del clorhidrato de papaverina IFA

En la figura 1 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de los resultados del estudio de especificidad realizado como parte de la validación del método por CLAR para el análisis del clorhidrato de papaverina IFA.

En la tabla 1 se reportan los resultados experimentales del estudio de la linealidad para el clorhidrato de papaverina IFA.

Los resultados de la medición del parámetro exactitud se muestran en la tabla 2.

En el estudio de la repetibilidad realizado a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de diez réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (0,11 %), para métodos cromatográficos.

Los resultados del estudio de precisión intermedia se reportan en la tabla 3.

Como parte de la validación llevada a cabo para el análisis del IFA de clorhidrato de papaverina se obtuvo como límite de detección 0,25 µg/mL mientras que el límite de cuantificación fue de 0,69 µg/mL.

Validación del método analítico por CLAR aplicable a la papaverina-100 inyectable para el control de calidad

En la figura 2 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de los resultados del estudio de especificidad.

En la tabla 2, se muestran los resultados del estudio de exactitud del método aplicable al producto terminado.

El valor del coeficiente de variación obtenido en el estudio de repetibilidad fue de 0,20 %. Mientras que los resultados del estudio de precisión intermedia, se resumen en la tabla 3.

Comparación estadística entre el método desarrollado y el método establecido

Los resultados en el estudio de comparación de métodos, se reportan en la tabla 4.

DISCUSIÓN

Validación de los métodos analíticos

Especificidad

En el estudio de especificidad del método aplicable al clorhidrato de papaverina IFA, se puede apreciar al comparar los cromatogramas A y B, correspondientes a la sustancia de referencia química y a la muestra clorhidrato de papaverina IFA, respectivamente, la marcada similitud que entre ellos se manifiesta pues sus tiempos de retención (t_r) son análogos entre sí. Los cromatogramas de las muestras sometidas a condiciones de estrés (C, D, E, F y G) nos sugieren que el procedimiento propuesto para el tratamiento de las muestras fue efectivo ya que se observaron evidencias de la esperada degradación del clorhidrato de papaverina IFA. Dichas evidencias se revelaron a partir de una disminución significativa de la señal correspondiente al clorhidrato de papaverina y la aparición de picos secundarios a otros tiempos de retención. Con los cromatogramas C, D, E, F y G se demuestra que los picos atribuibles a los productos de degradación del clorhidrato de papaverina: papaverinol y papaveraldina, descritos por Badea y colaboradores en 2010 (6), no interfieren en la determinación del IFA. Esto se debe a que dichos productos de degradación no eluyen al mismo tiempo que el clorhidrato de papaverina IFA. Los resultados obtenidos evidencian la especificidad del método y la factibilidad de su aplicación en el control de la calidad del IFA, así como también en la determinación de sus productos de degradación desde el punto de vista cualitativo.

Al analizar los resultados del estudio de especificidad del método aplicable a la papaverina-100 inyectable, no se observaron señales de los excipientes (A) de la formulación en la zona de elución de IFA del producto terminado, ya que, no se presentaron interferencias de picos adicionales en esta zona. Además fue observada una gran similitud entre los tiempos de retención correspondientes a la muestra (C) y la sustancia de referencia química (B). Los cromatogramas de las muestras sometidas

CONCLUSIONES

El método por CLAR, desarrollado y validado para el IFA de clorhidrato de papaverina, puede aplicarse en control de la calidad por ser un método específico, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas; con límites de detección y cuantificación de 0,25 µg/mL y 0,69 µg/mL, respectivamente.

El método por CLAR, validado para el producto terminado papaverina-100 inyectable, puede aplicarse en control de la calidad y el estudio de estabilidad por resultar específico, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas.

Con el empleo del método por CLAR se obtienen resultados de carácter certero que no difieren estadísticamente de los obtenidos a partir del método oficial por Espectrofotometría UV-VIS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Editorial Félix Varela, La Habana, 2001, p. 5-63.
2. Pathak S, Lakhwani D, Gupta P, Mishra BK, Shukla S, Asif MH, et al. Comparative transcriptome analysis using high papaverine mutant of *Papaver Somniferum* reveals pathway and uncharacterized steps of papaverine biosynthesis. PLoS One. 2013, 8(5). PubMed PMID: 3667846. doi: 10.1371/journal.pone.0065622.
3. Alcázar P, Gonzáles A, Romancec A. Tratamiento endovascular del vasospasmo cerebral inducido por hemorragia subaracnoidea aneurismática. Medicina Intensiva. 2008, 32(8), p. 625-648.
4. Vila Jato, J.L. Tecnología Farmacéutica. Volumen II. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Capítulo 3: Inyectables. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España. 2005, p. 157-248. (Libro de Consulta en versión electrónica).
5. Abdel-Ghani NT, Shoukry AF, Issa YM, Wahdan OA. Spectrophotometric determination of meclozine HCl and papaverine HCl in their pharmaceutical formulations. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002, 28, p. 373-378.
6. Badea IA, Vladescu L, David IG, David V, Litescu SC. Development of a new HPLC method for determination of papaverine in presence of its photooxidation products. Analytical Letters. 2010, 43, p.1217-1229. doi: 10.1080/00032710903518641. ISSN: 0003-2719.
7. Farmacopea de Estados Unidos/Formulario Nacional [USP 37/ NF 33]. Volumen III. The United States Pharmacopeial Convention. 12601 Twinbrook Parkway. Rockville. MD 20852. USA. (Libro de consulta en versión electrónica). 2015.

8. Kasperek R. Determination of diclofenac sodium and papaverine hydrochloride in tablets by HPLC method. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 2008, 65 (4), p. 403-408. ISSN 0001-6837.
9. Polski A, Kasperek R, Rogowska M, Iwaniak K, Sobótka-Polska K, Poleszak E. Dissolution Studies of Papaverine Hydrochloride from Tablets in Three Pharmacopoeia Apparatuses. *Polim Med- Original Papers*. 2015, 45 (1), p. 21-24.
10. Marchante P, Zumbado H, Gonzáles A, Álvarez M, Hernández L. Análisis Químico Farmacéutico: Métodos Clásicos Cuantitativos. Capítulo 1: Introducción al Análisis Químico Farmacéutico. Editorial Félix Varela, La Habana. 2008, p. 1-101. ISBN 9789590709357.
11. Anexo I: Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED). Cuba. 3-25. 2013.
12. Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation. FDA. Centre for Drug Evaluation and Research. 2001.
13. Bliesner DN. Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. USA: NJ, John Wiley & Sons, Inc; 2006.
14. Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang X. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Hoboken, NJ; John Wiley & Sons, Inc; 2004.
15. Hermann TW, Girreser U, Michalski P, Piotrowska K. Oxidation and degradation products of papaverine, part I: Gadamer and Schulemann's papaverinol synthesis revisited. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem*. 2002, 4, p.167-169.
16. Girresera U, Hermannb TW, Piotrowska K. Oxidation and degradation products of papaverine, part II [1]: Investigations on the photochemical degradation of papaverine solutions. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem*. 2003, 336, p. 401-405.
17. Castillo B, González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev Cubana Farm*. 1996, 30 (1). ISSN 1561-2988.
18. Martin-Smith M, Rudd DR. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. *Acta Pharm Jugosl* 1990, 40, p. 7-19.
19. Polo JC. Apuntes sobre Bioestadística aplicada a las Ciencias Farmacéuticas. Capítulo 1: Conceptos básicos de la bioestadística. Universidad de La Habana. 2011, p. 1-128. (Libro de Consulta en versión electrónica para estudiantes del Instituto de Farmacia y Alimentos).
20. Suárez Y. Manual Teórico-Práctico para alumnos de Ciencias Farmacéuticas que cursan Control de Medicamentos II Plan D. Capítulo I: Criterios de selección de los métodos analíticos

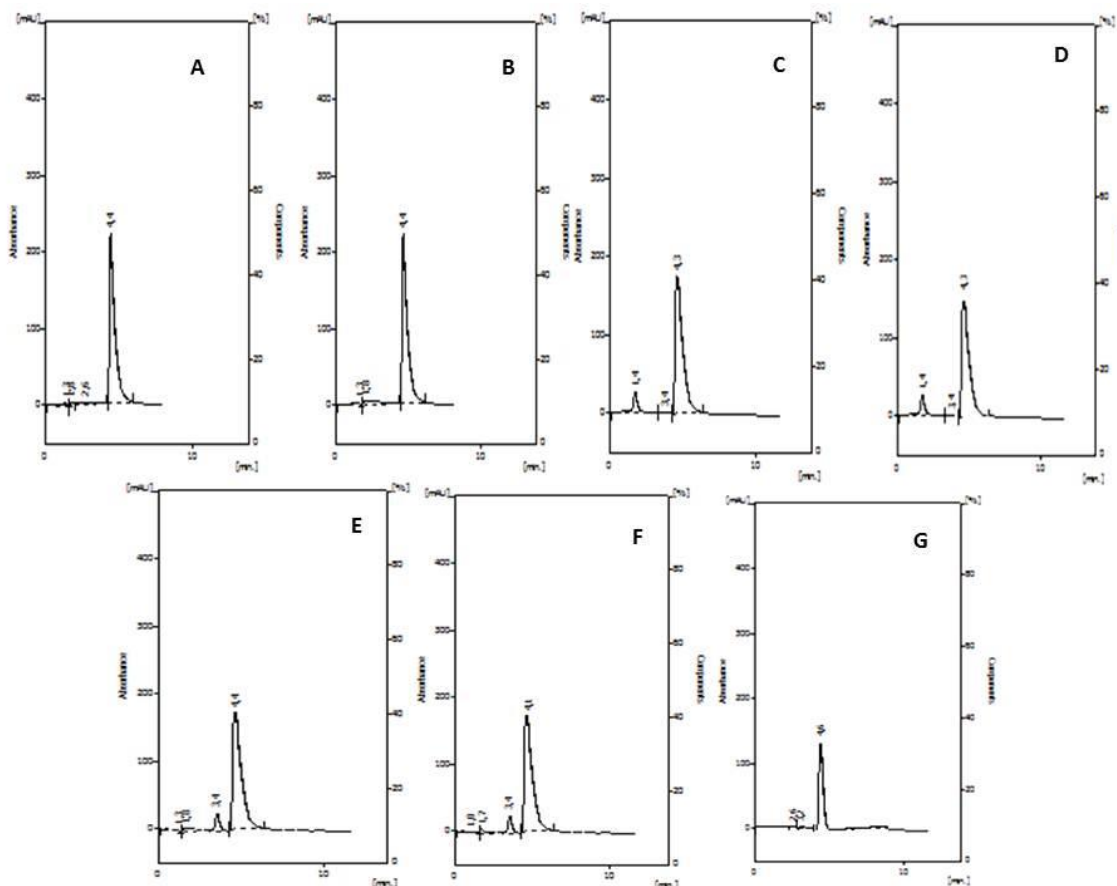


Figura 1. Especificidad del método para el IFA. (A)-Cromatograma de la sustancia de referencia química. (B)-Cromatograma de la muestra. (C)-Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida. (D)-Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica. (E)-Cromatograma de la muestra sometida a luz solar. (F)-Cromatograma de la muestra sometida a temperatura. (G)-Cromatograma de la muestra sometida a oxidación.

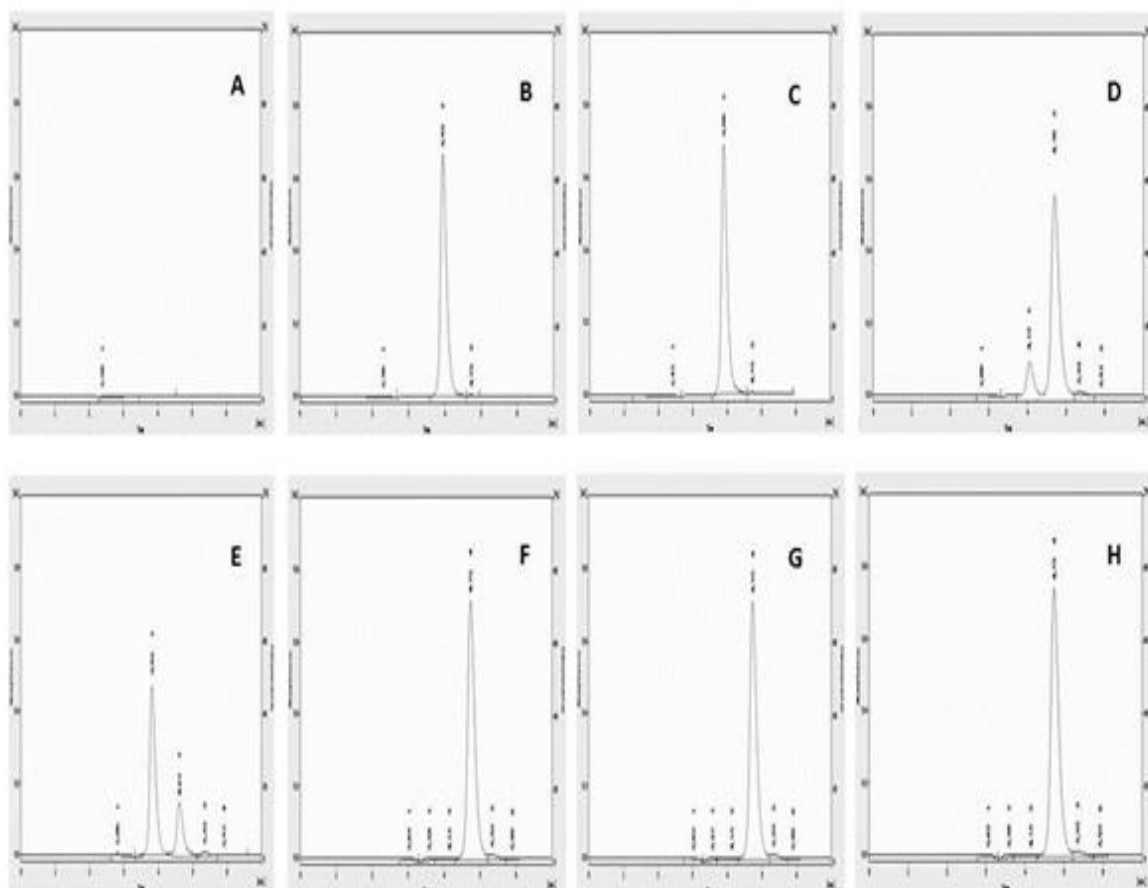


Figura 2. Especificidad del método para el producto terminado. (A)-Cromatograma del placebo. (B)-Cromatograma de la sustancia de referencia química. (C)-Cromatograma del producto terminado papaverina-100 inyectable. (D)- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida. (E)- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica. (F)- Cromatograma de la muestra sometida a la luz. (G)- Cromatograma de la muestra sometida a temperatura. (H)- Cromatograma de la muestra sometida a oxidación.



Tabla 1. Linealidad del método

Parámetros	Resultados	Límites
Ecuación de la recta	$Y = 7,651 X + 15,828$	$Y = bX + a$
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,999$	$r \geq 0,990$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0,998$	$r^2 \geq 0,980$
<i>Significación estadística de la varianza de la pendiente (b)</i>		
Desviación estándar relativa de la pendiente	$S_b \text{ rel}(\%) = 1,93$	$S_b \text{ rel}(\%) \leq 2,0\%$
<i>Coefficiente de variación de los factores de respuesta</i>		
Coefficiente de variación del factor de respuesta	$CV_f = 1,50 \%$	$CV_f \leq 5,0\%$

Tabla 2. Exactitud de los métodos

Resultados		Criterios de aceptación
IFA	Inyectable	
$\bar{R}_{\text{total}} = 99,97 \%$	$\bar{R}_{\text{total}} = 100,13\%$	$\bar{R}: 98,0 - 102,0 \%$
$CV_{\text{total}} = 0,11 \%$	$CV_{\text{total}} = 0,71 \%$	$CV \leq 2,0 \%$
$t_{\text{calc}} = 2,148$	$t_{\text{calc.}} = 1,890$	$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}}$
$t_{\text{tab}} = 2,306$	$t_{\text{tab.}} = 2,306$	
$G_{\text{calc}} = 0,557$	$G_{\text{calc.}} = 0,769$	$G_{\text{calc}} < G_{\text{tab}}$
$G_{\text{tab}} = 0,797$	$G_{\text{tab.}} = 0,797$	

Tabla 3. Precisión intermedia de los métodos

IFA		Inyectable	
Clorhidrato de papaverina (%)			
Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
99,08	99,23	100,45	100,25
99,15	99,34	100,44	100,36
99,22	99,21	100,25	100,41
99,41	99,22	99,98	99,87
99,32	99,15	100,12	99,86
99,38	99,08	100,08	100,15
99,28	99,16	100,01	100,16
99,34	99,05	100,25	100,25
99,11	99,06	99,87	100,08
99,16	99,17	99,85	99,87
$X_{analista\ 1} = 99,24\ %$ $S_1 = 0,11$	$X_{analista\ 2} = 99,17\ %$ $S_2 = 0,32$	$X_{analista\ 1} = 100,13\ %$ $S_1 = 0,20$	$X_{analista\ 2} = 100,13\ %$ $S_2 = 0,19$
$X_{total} = 99,21\ %$ $S = 0,11$ $CV = 0,11\ %$		$X_{total} = 100,11\ %$ $S = 0,189$ $CV_{total} = 0,19\ %$	
$F_{calc} = 2,87$ $t_{calc} = 0,557$		$F_{calc} = 0,95$ $t_{calc} = 0,020$	
$F_{tab} = 3,18\ gl\ 9/9$		$t_{tab} = 2,101$	



Tabla 4. Comparación entre métodos

Métodos	Resultados	Límites
Desarrollado (CLAR)	X= 100,22 % S= 0,177 %	$t_{cal} \leq t_{tab}$ $t_{tab} (11; 0,05) = 2,20$
Establecido (UV)	X= 99,57 % S=0,689 %	
t-Student	1,71	

