

Validación de un método cromatográfico para la valoración del Metamizol sódico en la Dipirona-600 y el Espasmoforte

Validation of a chromatographic method for the assessment of sodium metamizole in Dipyrone-600 and Spasmoforte

Jiovanna Contreras Roura^{a,*}, Susel Guach Wilson^a, Suharmy Pérez Martiatu^a, Tania Lafferte García^a,
Yessenia Hernández Fernández^a

^{a,*} **Revisión bibliográfica, montaje y validación del método cromatográfico. Procesamiento estadístico resultados y escritura de la publicación.** (0000-0001-5299-798X). Laboratorio de Control de la Calidad Físico-Químico, Empresa Laboratorios AICA+, Ave.23 S/N e/ 268 y 270, Reparto San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba, Código Postal 17100. jiovannac@aica.cu

Validación del método e introducción del mismo en la valoración de lotes Dipirona-600 y Espasmoforte. Modificación especificidad de calidad para los productos terminado (Dipirona-600 y Espasmoforte). (0000-0002-3530-9222) Laboratorio de Control de la Calidad Físico-Químico, Empresa Laboratorios AICA+, Ave.23 S/N e/ 268 y 270, Reparto San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba, Código Postal 17100. suselg@aica.cu

Revisión resultados y aprobación del protocolo e informe de validación del método en el laboratorio Control calidad Físico-Químico. (0000-0002-4968-7646). Laboratorio de Control de la Calidad Físico-Químico, Empresa Laboratorios AICA+, Ave.23 S/N e/ 268 y 270, Reparto San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba, Código Postal 17100. suharmyp@aica.cu.

Realización de los ensayos descritos en la BP-2020 para la identificación, solubilidad, contenido de agua y valoración de las materias primas (0000-0003-2605-1896). Laboratorio de Control de la Calidad Físico-Químico, Empresa Laboratorios AICA+, Ave.23 S/N e/ 268 y 270, Reparto San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba, Código Postal 17100. tania@aica.cu

Analista durante validación y en la realización de los ensayos para las materias primas analizadas (Identificación, solubilidad, contenido de agua y Valoración). (0000-0002-5155-288X). Laboratorio de Control de la Calidad Físico-Químico, Empresa Laboratorios AICA+, Ave.23 S/N e/ 268 y 270, Reparto San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba, Código Postal 17100. yesseniah@aica.cu

Recibido: 14 de julio de 2021;

Aceptado: 9 de agosto de 2021;

RESUMEN

Dipirone-600 (inyectable), es una formulación farmacéutica con acción analgésica y antiinflamatoria no esteroideo (AINE) de un compuesto químico derivado de la pirazolona, Metamizol sódico, inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. Debido al surgimiento y propagación de la enfermedad COVID-19 en Cuba y al cese de la importación de este medicamento desde China fue necesario realizar su producción en Cuba (UEB AICA+), para el tratamiento paliativo de la fiebre y el dolor en los pacientes con COVID-19 y otras afecciones. La valoración del Metamizol sódico (como ingrediente farmacéutico activo) en la Dipirone-600 y el Espasmoforte se realiza por Iodometría, método volumétrico que requiere condiciones controladas, porque diferentes factores pueden afectar su exactitud; además, la Dipirone es fotosensible y se oxida fácilmente. Debido a esto, el Laboratorio de Control de la Calidad físico-químico necesita disponer de un método sencillo, rápido y específico para garantizar la calidad del inyectable y para la realización de los estudios de estabilidad. Se validó un método isocrático en fase reversa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV para la valoración del Metamizol Sódico en la Dipirone-600 con vista a su introducción en el Laboratorio mencionado. Los parámetros de validación evaluados fueron: Especificidad, Linealidad, Exactitud y la Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia). Para la valoración del Metamizol sódico en el Espasmoforte (inyectable) sólo se evaluó la especificidad y la linealidad. El método cromatográfico para la valoración del Metamizol sódico, cumplió con los criterios de aceptación para cada parámetro de validación o desempeño evaluados y se empleó en el análisis de varios lotes de Dipirone-600 y un lote de Espasmoforte.

Palabra claves: Dipirone; Metamizol sódico; Espasmoforte; Cromatografía Líquida de Alta Resolución; validación y valoración.

ABSTRACT

Dipyrone-600 (injectable), is a pharmaceutical formulation with analgesic and non-steroidal anti-inflammatory action (NSAID) of a chemical compound derived from pyrazolone, Metamizole sodium, an inhibitor of prostaglandin synthesis. Due to the emergence and spread of the COVID-19 disease in Cuba and the cessation of the importation of this drug from China, it was necessary to carry out its production in Cuba (UEB AICA+), for the palliative treatment of fever and pain in patients with COVID-19 and other conditions. The valuation of Sodium Metamizole (as an active pharmaceutical ingredient) in Dipyrone-600 and Espasmoforte is carried out by iodometry, a volumetric method that requires controlled conditions, because different factors can affect its accuracy; Furthermore, Dipyrone is photosensitive and oxidizes easily. Due to this, the Physico-chemical Quality Control Laboratory needs to have a simple, fast and specific method to guarantee the quality of the injectable and to carry out stability studies. An isocratic method in reversed phase was validated by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection for the valuation of Metamizole Sodium in Dipyrone-600 with a view to its introduction in the mentioned Laboratory. The validation parameters evaluated were: Specificity, Linearity, Accuracy and Precision (Repeatability and Intermediate Precision). For the assessment of Metamizole sodium in Espasmoforte (injection), only specificity and linearity were assessed. The chromatographic method for the valuation of sodium Metamizole met the acceptance criteria for each validation or performance parameter evaluated and was used in the analysis of several batches of Dipyrone-600 and one batch of Espasmoforte.

Keywords: Dipyrone, Sodium Metamizole, Espasmoforte, HPLC, validation and titration.

INTRODUCCION

La COVID-19 es una enfermedad reciente debido al surgimiento de un nuevo coronavirus de ARN, que se caracteriza por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Entre los síntomas más comunes de la enfermedad y que son similares a los de la gripe se encuentran la fiebre, tos y astenia, entre otros, y puede progresar a neumonía intersticial grave y a otras enfermedades respiratorias agudas. Entre los medicamentos antipiréticos y analgésicos ampliamente utilizados en la etapa epidémica se encuentra el Metamizol o Dipirona; debido a la disponibilidad del fármaco, bajo costo y su alta prevalencia en el tratamiento del dolor y de la fiebre. (Tsahi T. Lerman et al, 2021; Hearn L, Derry S, Moore RA, 2016, Edwards J et al, 2002 y Hinz Bet al, 2007). El Metamizol o Dipirona es un derivado de la pirazolona, (ácido 1,5-dimetil-3-oxo-2-fenilpirazol-4il)-metilamino] metanosulfónico (IUPAC) (Metamizole, 2020, <https://doi.org/10.1111/bcp.14703>), con propiedades farmacológicas antiinflamatoria no esteroideo (AINE) e inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (Figura 1).

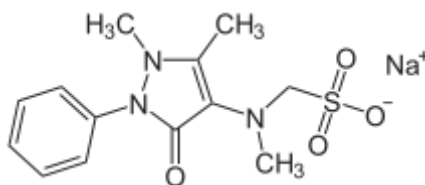


Fig. 1. Estructura química del Metamizol sódico (Dipirona).

Es un analgésico superior al paracetamol en dolores agudos de tipo moderado o medio; útil en dolores de tipo cólico. Es un pro-fármaco, que se hidroliza específicamente en dos agentes activos: N-metil-4-aminoantipirina (MAA) y 4-Aminoantipirina (AA). (Jasiecka A, Maślanka T, Jaroszewski JJ, 2014).

Debido al surgimiento y propagación de la enfermedad COVID-19 en Cuba y al cese de la importación desde China de este medicamento (Dipirona-600, inyectable); fue necesario realizar su producción en Cuba (Laboratorios Farmacéuticos AICA, UEB AICA+), para su empleo en el tratamiento de la fiebre y el dolor en los pacientes con COVID y otros pacientes. En el Laboratorio de Control de la Calidad UEB AICA+ la valoración del Metamizol sódico (ingrediente farmacéutico activo, IFA) en la Dipirona-600 y el Espasmoforte, se realiza por un método volumétrico (Iodometría, técnica del fabricante). Este método es el más empleado en la industria farmacéutica, y está descrito en diferentes Farmacopeas (Farmacopea Argentina, Edición 7, 2013, Farmacopea Británica 2020, Real Farmacopea Española, Edición 3, 2005, Farmacopea China, 1990 y Farmacopea Brasileña, 2010). Tiene como desventaja, que es inespecífico y engorroso porque requiere de condiciones controladas (bajas temperaturas); debido a que diferentes factores pueden afectar su exactitud. Además, la Dipirona es fotosensible y se oxida fácilmente. Debido a esto, se procedió al montaje y validación de un método cromatográfico (HPLC) que resultara rápido, sencillo y específico para la valoración del Metamizol Sódico (Materia prima) y en los inyectables Dipirona-600 y Espasmoforte; con vista a su implementación en los Laboratorios de Control de la Calidad físico-químico y mecánico, y en el de Control de Proceso; y para la realización de los estudios de estabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y Materiales

Metamizol sódico (Patrón secundario, Código: 205401, Valoración HPLC: 99.08 % y Agua: 5.14 %). Agua para inyección (Código: A2005118, UEB AICA+), disolución de Hidróxido de sodio 10 % (UEB AICA+), Ácido acético glacial (Lote: K51195756909, Merck), Acetonitrilo grado gradiente para HPLC (Lote: I0988730901, Merck), Metabisulfito de sodio (MP-8012191064, Lote: K50695357).

Se emplearon los materiales siguientes: Cristalería del laboratorio certificada: Probeta de 1000 mL, matraces volumétricos de 10 mL y 25 mL. Micropipetas variables 100-1000 μ L; Discovery y 20-200 μ L (Calibrada y Certificada Lab. Metrología AICA). Puntas amarillas para micropipetas, papel indicador de pH 0.5-5.5 (SIGMA-ALDRICH) y de pH 0-14 (Whatman).

Muestras de ensayo

Materia prima (IFA): Metamizol sódico, Lotes: C01-1800550, C 01-1800551, C01-1800552, C01-1800553, C01-1800569, C01-1800570 y C01-1800571 (Wuhan Wuyao Pharmaceutilcal, China).

Producto terminado: Dipirona-600 (Lotes: D22006, D22009, D22022 y D22028, UEB AICA+) y Espasmoforte (Lote: E2005).

Equipamiento

Balanza analítica Secura 224/1S (Sartorius, Alemania, ANO), estufa 30-360 (MEMMERT, Alemania), pHmetro GLP21 (Crison, CEE). Cromatógrafo Líquido (HPLC) Prominence (Shimadzu, Japón) equipado con desgasificador DGU-20A 5R, bomba cuaternaria LC-20 AD, auto inyector SIL-20 AC, horno CTO-20 AC, detector UV-Vis SPD-20 AV y controlador CBM-20 A acoplado a computadora. Se empleó el software LabSolutions para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas.

Condiciones cromatográficas:

Se empleó un método descrito por Daniella Carla Napoleão y col. 2015, al cual se le hicieron pequeñas modificaciones en relación a la composición de la fase móvil y el rango: como fase móvil una mezcla de Ácido acético glacial al 10 % y Acetonitrilo (75:25, v/v). Se empleó una columna Nucleosil RP-18, 100, 5 μ m, 250 x 4.6 mm (KNAUER, Alemania), a flujo de 0.7 mL/min y temperatura de 30°C. El volumen de inyección fue de 10 μ L y la detección a una longitud de onda (λ) de 285 nm. El tiempo de corrida o adquisición fue de 8 minutos.

Evaluación de los Parámetros de validación

Aptitud sistema: Se evaluó a partir de un patrón de Metamizol sódico a concentración teórica correspondiente al 100 % (0.3 mg/mL). El mismo fue analizado seis veces. Criterios de aceptación: Factor asimetría o cola: ≤ 2 , resolución ($R_s \geq 1.5$) entre la sustancia relacionada de la Dipirona y Coeficiente de variación ($CV \leq 2$ %) para inyecciones repetidas ($n=6$).

Especificidad: Se analizaron por triplicado el Diluyente (Fase Móvil), patrón Metamizol sódico a concentración de 100 %, el placebo correspondiente a ambos inyectables (Dipirona-600 y Espasmoforte) y las muestras de ensayo (Dipirona-600 y

Espasmofoorte). Criterio de aceptación: No se observan picos interferentes al analizar el diluyente y el placebo con el tiempo de retención (t_r) correspondiente al Metamizol sódico (IFA), obtenidos tanto para el patrón y las muestras de ensayo.

Especificidad por degradación: Se evaluó además para las muestras de producto terminado Dipirona-600 (Lote: D22006) y el Espasmofoorte (Lote: E2005) sometidas a una degradación forzada o ensayo de estrés: Debido a la estructura química del IFA, fácilmente oxidable, se empleó como agente oxidante (oxidación) el oxígeno ambiental para lo cual las muestras del inyectable se dejaron a temperatura ambiente hasta que ocurra un cambio de coloración incoloro o ligeramente amarillo a amarillo (5 h). Para la Fotólisis se expuso el inyectable a una $\lambda = 254$ nm durante 1 h y para la Termólisis se sometió el inyectable a 70 °C durante 1 h. Para la Hidrólisis básica y ácida a 3 mL del inyectable se adicionó 0.5 mL de NaOH 1 mol/Litro o HCL 1 mol/Litro, se calentó a 70 °C durante 1 h, respectivamente. Para el análisis de las muestras por el cromatógrafo, se neutralizaron y/o ajusto el pH entre 2-8 para evitar daño de la fase estacionaria de la columna. Criterio de aceptación: El método es específico si los picos desconocidos obtenidos durante el ensayo de estrés o degradación forzada no interfieren con los tiempos de retención (t_r) correspondiente al Metamizol sódico (Resolución, $R_s \geq 1.5$) obtenido en la muestra de ensayo (Dipirona-600).

Linealidad del sistema: Se prepararon tres réplicas de curva de calibración en fase móvil. Se empleó como rango de concentración: 80-120 % (Concentración final HPLC: 0.24-0.36 mg/mL, Dipirona-600 y 0.20-0.30 mg/mL para el Espasmofoorte). Criterios de aceptación: Análisis de regresión lineal ($r \geq 0.99$, $p \leq 0.05$, $r^2 \geq 0.98$, pendiente recta calibración (b) significativo 0 ($p \leq 0.05$) e intercepto (a) no significativo 0. Coeficiente variación de los factores respuesta: $CVF \leq 5$ %.

Exactitud: Se prepararon tres réplicas a concentración teórica correspondiente al 80, 100 y 120 % Concentración final HPLC: 0.24, 0.3 y 0.36 mg/mL en el placebo correspondiente (Disolución acuosa de metabisulfito de sodio a concentración final 0.002 mg/mL). Criterios de aceptación: Recobrado entre 97-103 % para la materia prima, 98-102 % (Producto Terminado, Dipirona-600) y % CV_{Total} Recobrado ≤ 2 %. Análisis regresión lineal: $r \geq 0.99$ ($p \leq 0.05$), Pendiente recta (b) cercano a 1, $p \leq 0.05$ y/o intervalo de confianza 95 % (IC 95 %) no incluya el 0. Intercepto (a) no significativo de cero ($p \geq 0.05$) y/o el IC 95 % incluya el 0.

Precisión: Se prepararon tres réplicas a concentración teórica correspondiente al 100 % (Concentración final HPLC: 0.3 mg/mL). Para evaluar la Repetibilidad se analizaron por sextuplicado en el mismo día y analista, y para la Precisión intermedia fueron analizadas por triplicado por dos analistas en dos días consecutivos. Criterio de aceptación para la Repetibilidad: $CV \leq 2$ % para el ensayo de Repetibilidad. Criterio de aceptación para la Precisión intermedia: $CV_{Total} \% \leq 2$ % (Analistas y Días) y ANOVA: no diferencias en los resultados obtenidos entre los analistas y días ($p \geq 0.05$).

Valoración de las muestras de ensayo (Materia prima y productos terminado: Dipirona-600 y Espasmofoorte): Se prepararon tres réplicas a concentración teórica correspondiente al 100 % (Concentración final HPLC: 0.3 mg/mL) para las muestras

de materia prima (7 lotes) y producto terminado (tres lotes de Dipirona-600 y un lote de Espasmoforte). Criterios de aceptación para el contenido del Metamizol sódico: 99-101 % para la materia prima (IFA), con respecto a la sustancia seca y para los productos terminado de 90-110 % (270-330 mg/mL, Dipirona-600) y (225-275 mg/mL, Espasmoforte).

Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico de los resultados se trabajó para una probabilidad del 95 % ($p = 0,05$) y se emplearon los programas Excel y el STATISTIC 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método por HPLC validado para la valoración del Metamizol sódico en la materia prima y los productos terminados (Dipirona-600 y Espasmoforte) es rápido (tiempo corrida 8 min), sencillo y específico (Figura 2). Se obtuvieron tiempos de retención de 4,8 min, correspondiente a una sustancia relacionada C o E de los cuatros sustancias relacionadas y de 5,7 min para el Metamizol sódico (Dipirona) con resolución entre los picos de 2.17 (≥ 1.5) y factor asimetría de 1.20 y 2.0, respectivamente). El método propuesto permite la detección (285 nm) y cuantificación de una de las cuatro sustancias relacionadas, la misma no se pudo identificar por no contar con los patrones correspondientes; lo cual constituye una limitación del estudio. Además, a los 4,8 min co-eluye también el metabisulfito de sodio, agente antioxidante que se emplea en ambos inyectables al analizar el placebo.

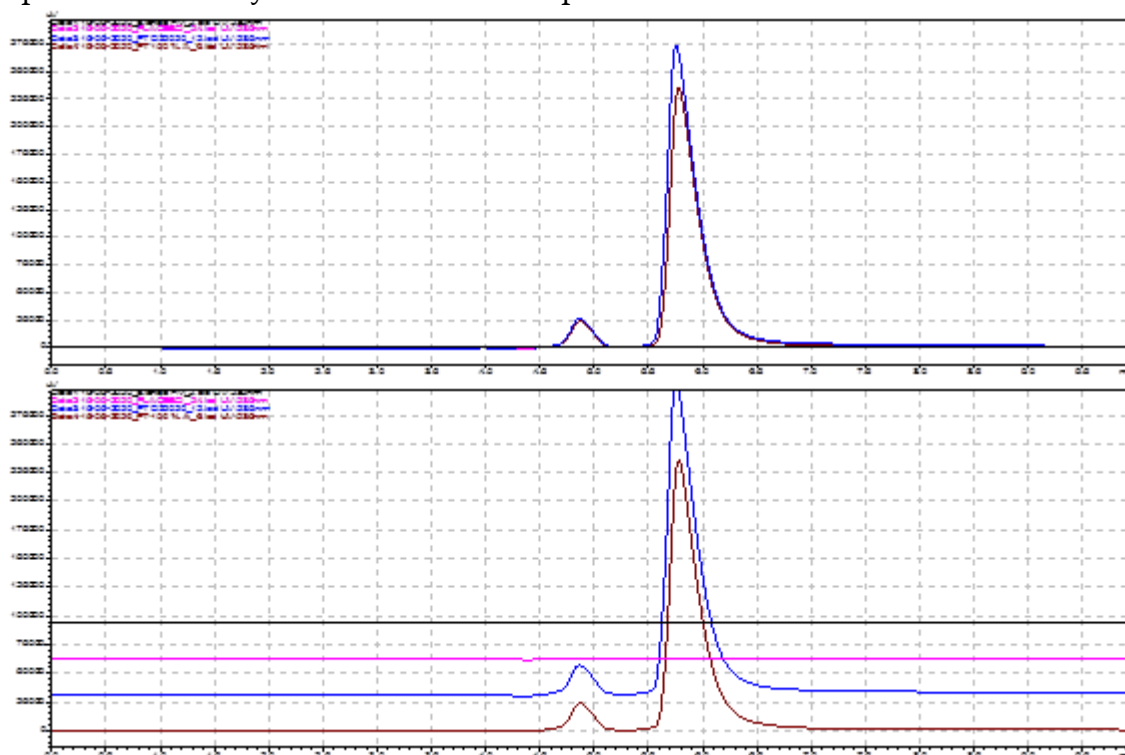
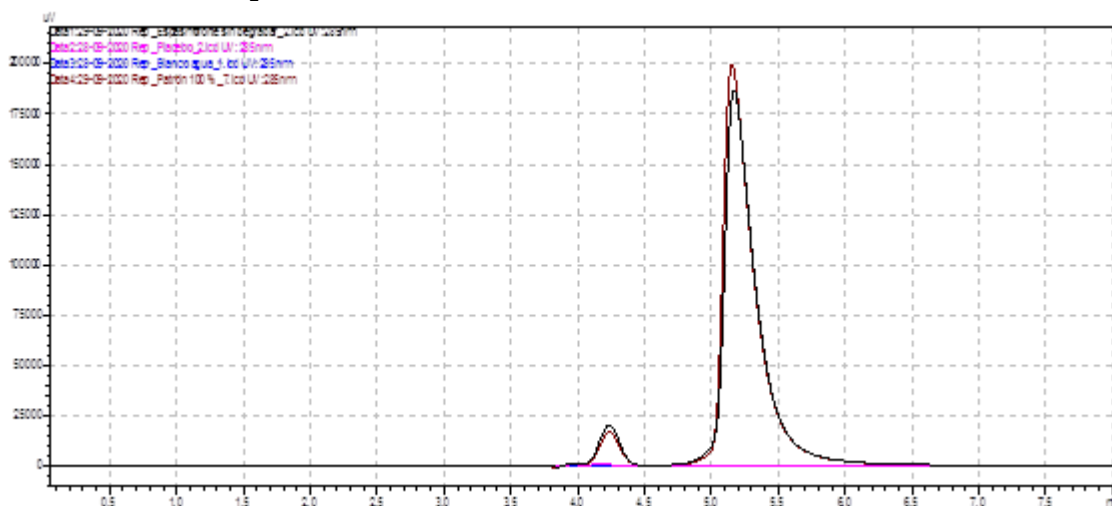


Fig. 2. Cromatogramas obtenidos en la evaluación de la especificidad del método para la valoración de la Dipirona-600 (Materia Prima y Producto Terminado).

Leyenda Negro: Fase móvil (Diluyente del patrón) Morado: Placebo (Dipirona-600) Carmelita: Patrón de Metamizol sódico a concentración correspondiente al 100 % (Sust. Relacionada $tr_1 = 4.8 \text{ min} \pm 0.001$ y Metamizol sódico $tr_2 = 5.75 \text{ min} \pm 0.001$) Azul: Dipirona-600 (Lote D22022), a concentración correspondiente al 100 % (Sustancia Relacionada: $tr_1: 4.8 \text{ min}$ y Metamizol sódico $tr_2: 5.78 \pm 0.001$)

Entre los métodos instrumentales descritos en la literatura el más empleado es la Cromatografía de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa (C-8 y C-18) para el análisis de la Dipirona, sus productos de degradación y de las sustancias relacionadas en diferentes tipos de muestras: formulaciones farmacéuticas (tabletas e inyectables) y muestras ambientales (Mayorga R, Sánchez JE, Gutiérrez RF, Calixto-Romo M., 2017; Daniella Carla Napoleão, Daniela Ribeiro da Silva, Joan M. Rodríguez Díaz, Mohand Benachour, Luis R. Bravo Sánchez y Valdinete da Silva, 2015; Chusnul Chotimah, Sudjadi, Sugeng Riyanto, and Abdul Rohman, 2015; Galaon T, Radulescu M, David V, Medvedovici A. 2012 y Senyuva H, Ozcan S, Aksahin I, Kabasakal B, 2005). La composición de la fase móvil varía, desde el empleo de mezclas sencillas y complejas con uso de disoluciones amortiguadoras, pares iónicos, etc. La detección se realiza en el ultravioleta y pueden emplearse diferentes longitudes de onda (254 nm, 275 nm, 285 nm y 290 nm); debido al espectro de absorción ultravioleta del Metamizol sódico. Los métodos espectrofotométricos también han sido empleados para la valoración del Metamizol o Dipirona, con detección en el ultravioleta a longitudes de onda entre 200-290 nm. (Achim H, 2018 y Quino, Israel; Choque, Rigoberto; Cáceres C., Luis Fernando, 2005). A pesar que el máximo de absorción es a 271 nm, se empleó la longitud de onda de 285 nm porque permite una mejor detección de una de las sustancias relacionadas/productos de degradación; y del metabisulfito de sodio empleado como antioxidante en ambos inyectables (Dipirona y Espasmoforte).

El método también es específico para la valoración de la Dipirona en el Espasmoforte, inyectable que contiene dos IFA (Dipirona y el Clorhidrato de Camilofina) (Figura 3). Además, se demostró que el método también es específico para el análisis de muestras de Dipirona-600 sometidas a degradación forzada (Ensayo de estrés) (Tabla 1 y 2); porque los picos desconocidos obtenidos no interfirieron con el tiempo de retención correspondiente al Metamizol sódico y la resolución entre los picos fue de 1.5-4.8.



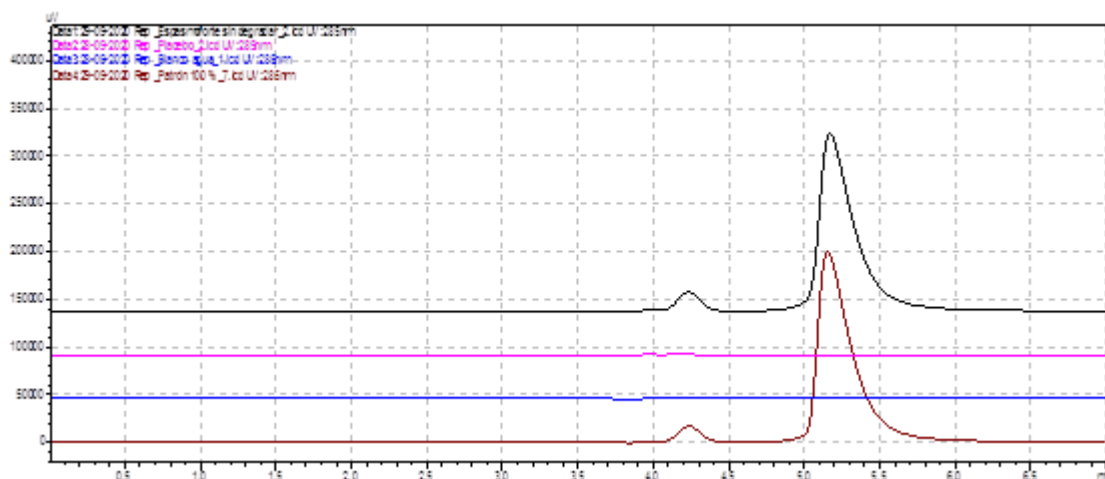


Fig. 3. Cromatogramas obtenidos en la evaluación de la especificidad del método para la valoración del Espasmoforte (Producto Terminado).

Leyenda: Azul: Diluyente (Agua para inyección) Carmelita: Patrón de Metamizol sódico (100 % ó 250 mg/mL) Morado: Placebo Negro: Espasmoforte (Lote: E2005) Pico 1: Sustancia relacionada del Metamizol sódico tr1: 4,24 min Pico 2: Metamizol sódico tr2: 5,17 min.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la evaluación de la especificidad del método: Ensayo de estrés o degradación forzada de la Dipirona-600 (Lote: D22006, UEB aica+). (Promedio $\pm$ DE, n= 3).

Compuesto	Pico (No)	tr (min)	Área (%)	Factor asimetría	Rs
Muestra sin degradar: Antes del ensayo estrés					
Sust. Realc+Placebo	1	4.81 $\pm$ 0.001	6.45	0.94 $\pm$ 0.011	-
IFA	2	5.64 $\pm$ 0.001	93.55	1.82 $\pm$ 0.008	1.82
Oxidación					
IFA	1	5.60 $\pm$ 0.001	100	2.21 $\pm$ 0.052	-
Fotólisis					
Sust. Realc+Placebo	1	4.81 $\pm$ 0.001	5.63	0.95 $\pm$ 0.019	-
IFA	2	5.63 $\pm$ 0.001	90.98	1.90 $\pm$ 0.013	1.81
Desconocido	3	6.71 $\pm$ 0.000	3.39	1.05 $\pm$ 0.003	2.39
Termólisis					
Sust. Realc+Placebo	1	4.81 $\pm$ 0.000	2.22	0.99 $\pm$ 0.006	-
IFA	2	5.58 $\pm$ 0.001	94.66	2.43 $\pm$ 0.004	1.64
Desconocido	3	7.45 $\pm$ 0.000	3.12	1.03 $\pm$ 0.007	3.90
Hidrólisis ácida					
Desconocido	1	3.81 $\pm$ 0.001	1.53	0.85 $\pm$ 0.06	-
IFA	2	5.63 $\pm$ 0.002	96.32	1.39 $\pm$ 0.011	4.84
Desconocido	3	7.46 $\pm$ 0.002	2.15	1.02 $\pm$ 0.019	4.05
Hidrólisis básica					
Desconocido	1	3.82 $\pm$ 0.001	2.34	0.93 $\pm$ 0.030	-
IFA	2	5.58 $\pm$ 0.005	96.43	1.90 $\pm$ 0.033	4.56
Desconocido	3	7.47 $\pm$ 0.000	1.23	1.05 $\pm$ 0.013	4.37

Criterios aceptación:

- Los picos desconocidos obtenidos durante la degradación forzada de las muestras, no interfieren con el tiempo de retención (t_r) correspondiente al Metamizol sódico (Dipirona-600).
- Resolución entre picos (R_s) $\geq 1,5$: Metamizol sódico (IFA) y picos desconocidos.
- Degradación del IFA ≤ 20 %.

Para las muestras sometidas a:

- Fotólisis: se obtuvo una degradación del 5.63 % (Valoración final 94.37 %) y un pico desconocido a los 6.71 min.
- Termólisis: se determinó una degradación de un 3.12 % (Valoración final 96.88 %) y se observó un pico desconocido a los 7.45 min.
- Oxidación: resultó una degradación del 15.43 %, con incremento del área del pico en relación al blanco correspondiente.
- Hidrólisis ácida: mostró una degradación de un 3.68 % (Valoración final 96.32 %) y se obtuvieron dos picos desconocidos a tiempo de retención de 3.81 min y 7.46 min.
- Hidrólisis básica: se obtuvo una degradación del 3.57 % (Valoración final 96.43 %) y se observaron dos picos desconocidos a tiempo de retención de 3.82 min y 7.47 min.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la evaluación de la especificidad del método: Ensayo de estrés o degradación forzada para el Espasmofores (Lote: E2005, UEB aica+). (Promedio $\pm$ DE, $n=3$)

Compuesto	Pico (No)	t_r (min)	Área (%)	Factor asimetría	R_s
Muestra sin degradar: Antes del ensayo estrés					
Sust. Relc+Placebo	1	4,24 $\pm$ 0,00	6,06 $\pm$ 0,19	1,09	-
Metamizol sódico	2	5,17 $\pm$ 0,00	93,94 $\pm$ 0,19	1,88	2,75 $\pm$ 0,00
Hidrólisis ácida					
Sust. Relc+Placebo	1	4,24 $\pm$ 0,00	5,30 $\pm$ 0,02	1,08	-
Metamizol sódico	2	5,15 $\pm$ 0,00	94,70 $\pm$ 0,02	2,10	2,67 $\pm$ 0,00
Oxidación (H₂O₂)					
Desconocido	1	3,94 $\pm$ 0,00	0,9 $\pm$ 0,05	-	-
Sust. Relc+Placebo	2	4,19 $\pm$ 0,00	9,3 $\pm$ 0,28	-	0,97 $\pm$ 0,01
Metamizol sódico	3	5,17 $\pm$ 0,00	77,88 $\pm$ 0,84	2,15	2,72 $\pm$ 0,01
Desconocido	4	6,01 $\pm$ 0,00	2,71 $\pm$ 0,09	1,08	2,65 $\pm$ 0,01
Desconocido	5	6,63 $\pm$ 0,01	1,47 $\pm$ 0,05	-	-
Desconocido	6	6,74 $\pm$ 0,00	2,88 $\pm$ 0,08	-	-
Desconocido	7	8,56 $\pm$ 0,00	3,96 $\pm$ 0,06	1,03	4,41 $\pm$ 0,03
Fotólisis					
Sust. Relc+Placebo	1	4,25 $\pm$ 0,00	5,64 $\pm$ 0,17	1,09	-
Metamizol sódico	2	5,15 $\pm$ 0,00	94,36 $\pm$ 0,17	2,03	2,68 $\pm$ 0,01
Termólisis					
Sust. Relc+Placebo	1	4,24 $\pm$ 0,00	5,39 $\pm$ 0,06	1,07	-
Metamizol sódico	2	5,12 $\pm$ 0,00	94,61 $\pm$ 0,06	2,20	2,50 $\pm$ 0,00
Hidrólisis básica					
Sust. Relc+Placebo	1	4,23 $\pm$ 0,00	3,94 $\pm$ 0,07	1,09	-
Metamizol sódico	2	5,15 $\pm$ 0,00	96,06 $\pm$ 0,07	2,33	2,71 $\pm$ 0,00
Criterios aceptación:					
- Los picos desconocidos obtenidos durante la degradación forzada de las muestras, no interfieren con el tiempo de retención (t_r) correspondiente al Metamizol sódico ($R_s \geq 1,5$).					

En resumen, el método cromatográfico validado es específico para el análisis de las muestras sometidas a degradación forzada, obteniendo por cientos de degradación del IFA para la Dipirona-600 no mayor del 20 %; y la degradación fue mayor para las muestras sometidas a oxidación y fotólisis, lo cual coincide con lo descrito en la literatura especializada. (Daniela Carla Napoleão, 2015)

Tabla 3. Linealidad del Sistema: Materia prima, Dipirona-600 y Espasmoforte.

Estadística	Criterios de Aceptación	Materia Prima	Dipirona-600	Espasmoforte
Recta calibración	$y = bx + a$	$y = 47808,73x - 650260$	$y = 43057,86x - 28918,46$	$y = 110570 x + 30521,39$
Análisis regresión lineal	$r (\geq 0.99)$	0,9994	0,9985	0,9995
	Regresión (p < 0.05)	0,0000	0,0000	0,0000
	$r^2 (\geq 0.98)$	0,9988	0,9970	0,9990
Factores respuesta	CV F $\leq 5 \%$	2,6	0,90	0,86

El método es lineal en el rango de concentración evaluado (80-120 % contenido Metamizol sódico para la Dipirona-600 y el Espasmoforte) ($r \geq 0.99$, $p = 0,000$ y $r^2 \geq 0.98$, Tabla 3 y Figura 4, 5 y 6), exacto con por ciento de recobrado mayor del 99 % para los tres niveles de concentración evaluados para el IFA y la Dipirona-600 (Tabla 4 y 5 y Figura 7 y 8); y preciso con coeficiente de variación menor 2 % en ambos ensayos (Tabla 6, 7 y 8). No hubo diferencias en los resultados obtenidos entre los analistas y los días (Precisión intermedia), obteniendo coeficiente de variación menor al 2 %.

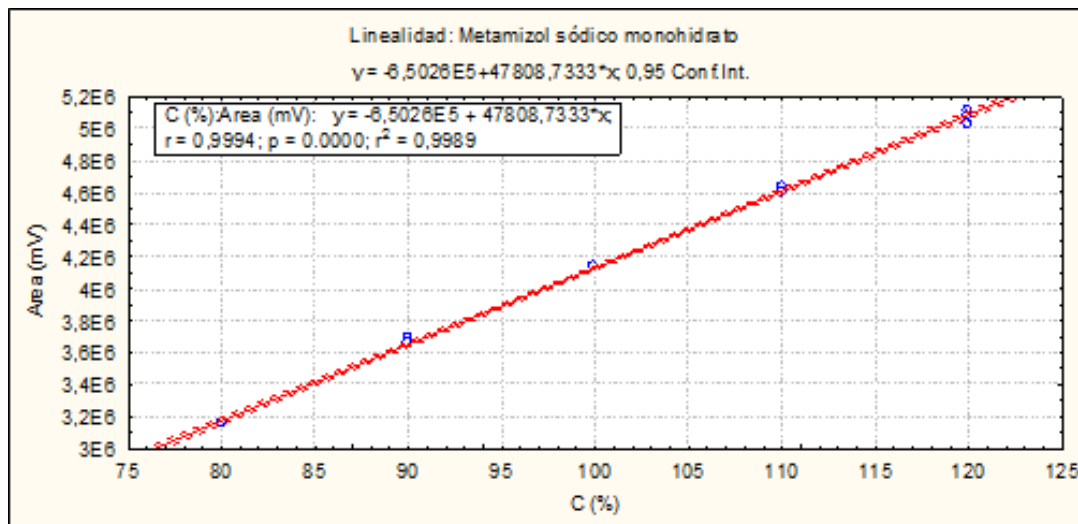


Fig. 4. Linealidad del sistema (Materia Prima, IFA): Curva de calibración: área del pico contra concentración (%) del Metamizol sódico.

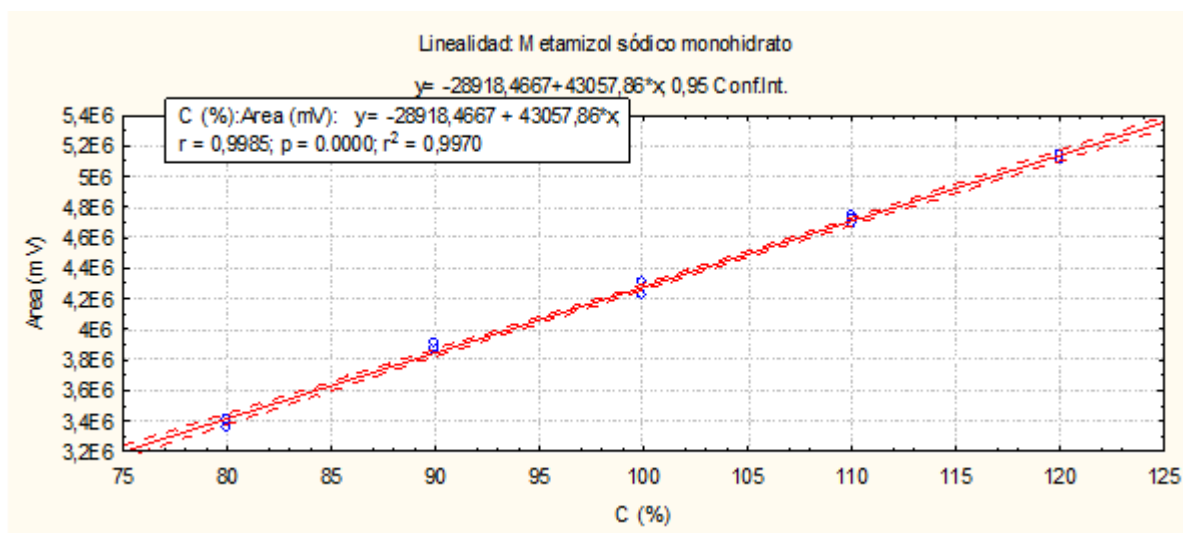


Fig. 5. Linealidad del sistema (Dipirona-600): Curva de calibración: área del pico contra concentración (%) del Metamizol sódico

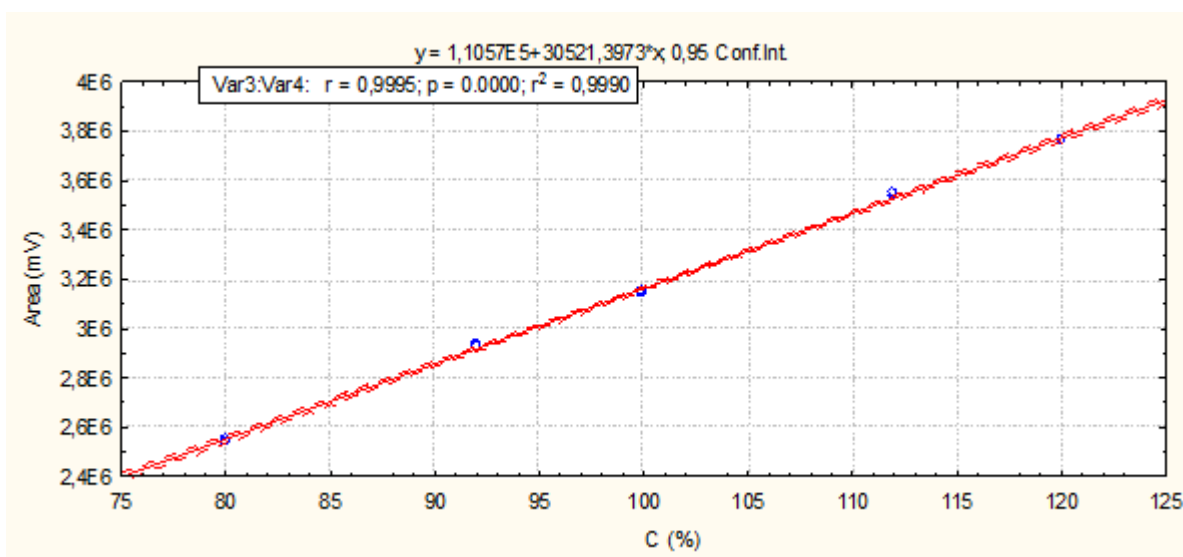


Fig. 6. Linealidad del sistema (Espasmofoorte): Curva de calibración: área del pico contra concentración (%) del Metamizol sódico.

Tabla 4. Evaluación de la Exactitud: Materia prima (IFA)

Réplica	Área			C obtenida (%)			% R		
	80%	100 %	120 %	80%	100 %	120 %	80%	100 %	120 %
1	3156108	4142561	5112492	79,6	100,2	120,5	99,52	100,25	100,45
2	3159949	4140264	5022267	79,7	100,2	118,6	99,62	100,20	98,87
3	3156108	4140903	5081716	79,6	100,2	119,9	99,52	100,21	99,91
Promedio	3157388,3	4141242,6	5072158,3	79,6	100,2	119,7	99,6	100,2	99,7
DE	2217,6	1185,5	45865,5	0,05	0,02	0,96	0,06	0,02	0,80
% CV	0,07	0,03	0,90	0,06	0,02	0,80	0,06	0,02	0,80
Promedio (n= 9): 99.8									
DE: 0.50									
% CV R Total: 0.50									
Criterios de aceptación:									
- % Recobrado: 98-102 % y CV R (%): < 2 %									
- Análisis regresión lineal: b cercano a 1 y/o IC 95% no incluya el 0, r > 0.99 (p < 0.05), a cercano a 0 y/o IC									

95% incluya el cero

Tabla 5. Evaluación de la Exactitud: Dipirona-600

Réplica	Área pico			C obtenida (%)			% Recobrado		
	80%	100 %	120 %	80%	100 %	120 %	80%	100 %	120 %
1	3350839	4230546	5108800	78,5	98,9	119,3	98,12	98,92	99,43
2	3391214	4300789	5107497	79,4	100,6	119,3	99,29	100,56	99,41
3	3413732	4314391	5136217	80,0	100,9	120,0	99,94	100,87	99,96
Promedio	3385261,67	4281908,67	5117504,67	79,3	100,1	119,5	99,1	100,1	99,6
DE	31866,21	44998,29	16218,45	0,74	1,05	0,38	0,93	1,05	0,31
% CV	0,94	1,05	0,32	0,93	1,04	0,32	0,93	1,04	0,32

Recobrado: Promedio (n= 9): 99.61 % DE: 0.84, % CV R Total: 0.84 %

Criterios de aceptación:

- % Recobrado: 97-103 % y CV R (%): ≤ 2 %
- Análisis regresión lineal: a cercano a 0 y/o IC 95% incluya el 0, b cercano a 1 y/o IC 95% no incluya el 0, $r > 0.99$ ($p < 0.05$)

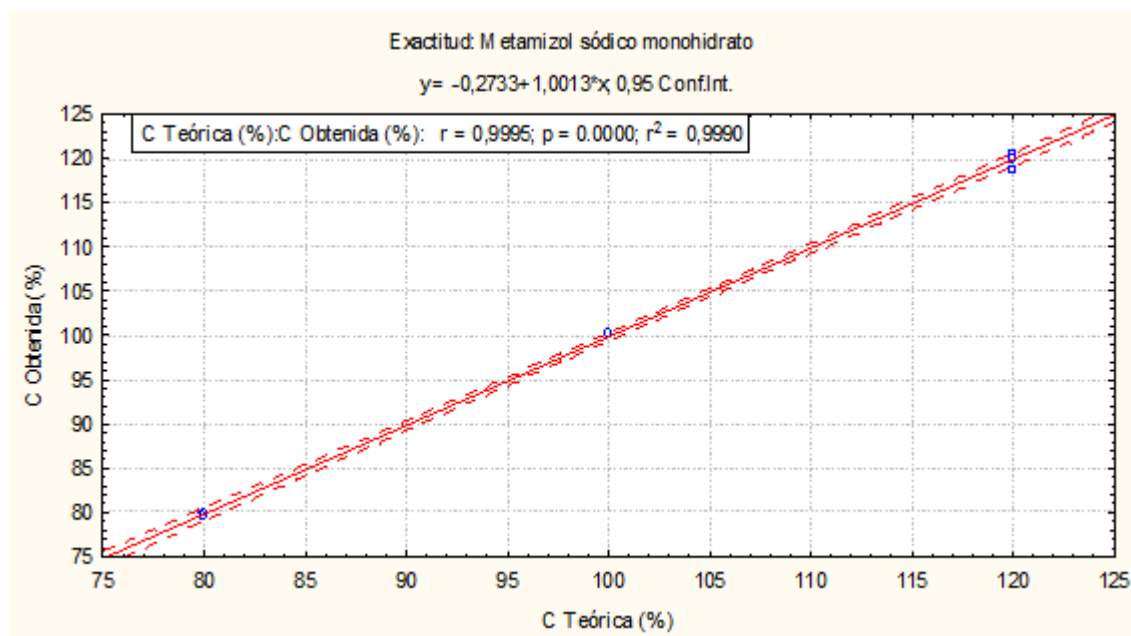


Fig. 7. Evaluación de la linealidad del método para la exactitud (IFA): Concentración obtenida (%) contra concentración teórica (%).

	Valor	DE	t	p	IC $\pm$ 95 %
Intercepto	-0,273307	1,225928	-0,22294	0,829949	-3.17217;3.62551
Pendiente	1,001260	0,012099	82,75550	0,000000	0.97265;1.029870

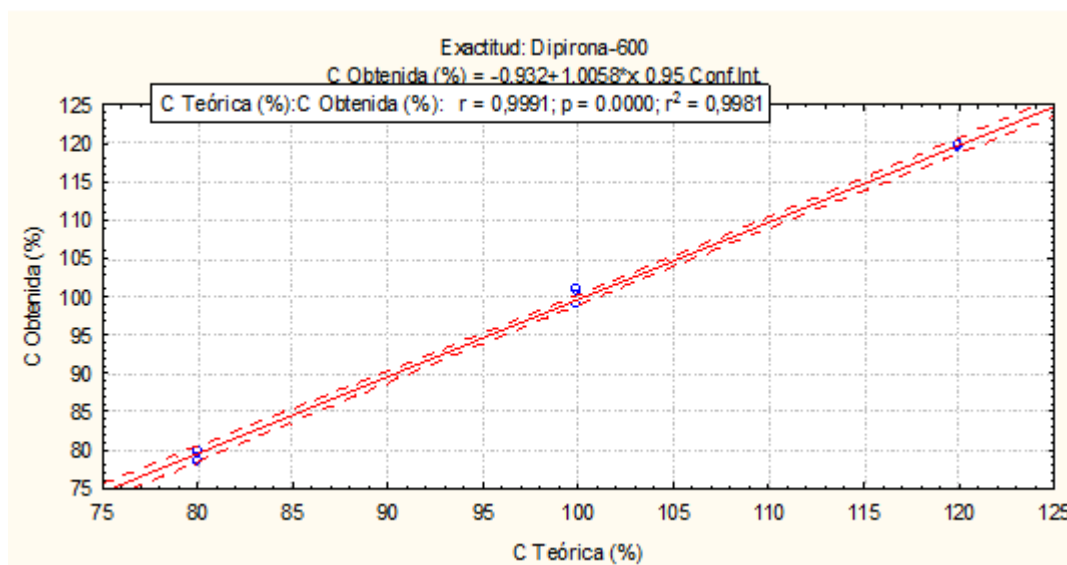


Fig. 8. Evaluación de la linealidad del método para la exactitud (Dipirone-600): Concentración obtenida (%) contra concentración teórica (%).

	Valor	DE	t	p	IC $\pm$ 95 %
Intercepto	-0,932026	1,670919	-0,55779	0,594367	-4,88312; 3,019070
Pendiente	1,005761	0,016491	60,98939	0,000000	0,96677; 1,044756

IC: Intervalo de confianza

Tabla 6. Evaluación de la Precisión: Ensayo de Repetibilidad.

Réplica	C (%)
1	100,1
2	100,3
3	100,2
4	100,2
5	100,2
6	100,2
Promedio (n=6)	100,20
DE	0,08
CV (%)	0,08
Criterio aceptación: CV (%) $\leq$ 2 %	

Tabla 7. Evaluación de la Precisión: Ensayo de Precisión intermedia evaluando la influencia de los días en los resultados.

Día	Réplica	Analista 1	Analista 2
1	1	100,1	100,1
	2	100,2	100,1
	3	100,2	100,1
Promedio (n=3)		100,16	100,12
DE		0,07	0,03
CV _{Día 1} (%)		0,07	0,03
2	1	100,3	100,1
	2	100,2	100,3
	3	100,2	100,1
Promedio (n=3)		100,23	100,19
DE		0,08	0,13

CV _{Día 2} (%)	0,08	0,13
Promedio (n= 6)	100,20	100,17
DE	0,07	0,10
CV _{Días} (%)	0,07	0,10
ANOVA (Días, p > 0.05)	0,1411	
Promedio (n= 12)	100,18	
DE	0,09	
CV Total (%)	0,09	
ANOVA: Analistas v Días (p > 0.05)	1.000	
Criterios de aceptación: CV Total (%) ≤ 2 % y ANOVA: No diferencia en los resultados entre Analistas y Días (p > 0.05)		

Tabla 8. Evaluación de la Precisión: Ensayo de Precisión intermedia evaluando la influencia de los analistas en los resultados.

Analista	Réplica	Día 1	Día 2
1	1	100,1	100,3
	2	100,2	100,2
	3	100,2	100,2
Promedio (n=3)		100,16	100,23
DE		0,07	0,08
CV _{Analista 1} (%)		0,07	0,08
2	1	100,1	100,1
	2	100,1	100,3
	3	100,1	100,1
Promedio (n=3)		100,12	100,19
DE		0,03	0,13
CV _{Analista 2} (%)		0,03	0,13
Promedio (n= 6)		100,1	100,2
DE		0,06	0,10
CV _{Analistas} (%)		0,06	0,10
ANOVA (Analistas, p > 0.05)		0,1411	
Promedio (n= 12)		100,18	
DE		0,09	
CV Total (%)		0,09	
ANOVA: Analistas v Días (p > 0.05)		1.000	
Criterios de aceptación: CV Total (%) ≤ 2 % y ANOVA : No diferencia en los resultados entre Analistas y Días (p > 0.05)			

Tabla 9. Valoración de la muestra de ensayo: Metamizol sódico, materia prima.

Lote	Réplica	Área pico (mV)	C (%)	C (mg/mL)
C01-1800550	Promedio	1978947.3	99.4	0.298
	DE	6687,89	0,34	0,001
	CV (%)	0,3	0,34	0,34
C01-1800551	Promedio	2044025	99.5	0.299
	DE	9928,82	0,48	0,001
	CV (%)	0,49	0,49	0,49
C01-1800552	Promedio	2036126.7	99.3	0.298
	DE	5239,83	0,26	0,001

	CV (%)	0,3	0,26	0,3
C01-1800553	Promedio	2051577.3	100.0	0.300
	DE	8552,20	0,42	0,001
	CV (%)	0,4	0,42	0,42
C01-1800569	Promedio	2034004.6	99.3	0.298
	DE	6266,30	0,31	0,00
	CV (%)	0,31	0,31	0,31
C01-1800570	Promedio	2034236.0	99.2	0.298
	DE	1438,03	0,07	0,0002
	CV (%)	0,07	0,07	0,07
C01-1800571	Promedio	2052395.3	100.2	0.301
	DE	3797,53	0,19	0,001
	CV (%)	0,19	0,19	0,19
Criterio aceptación: Contenido 99-101 % Metamizol sódico, con respecto a la sustancia seca.				

Tabla 10. Valoración de la muestras de ensayo: Dipirona-600. (Promedio $\pm$ DE, n= 3)

Lote	Réplica	Área pico (mV)	C (%)	C (mg/mL)
D22009	Promedio	4370860,3	102,2	306,5
	DE	7111,6	0,2	0,5
	CV (%)	0,2	0,2	0,2
D22022	Promedio	4489171,7	104,9	314,8
	DE	18958,68	0,44	1,32
	CV (%)	0,42	0,42	0,42
D22028	Promedio	4250297.33	99,43	298,3
	DE	8635.77	0,20	0,56
	CV (%)	0.20	0,20	0.19
Criterio aceptación: 90-110 % (270-330 mg/mL) contenido de Metamizol sódico.				

Tabla 11. Valoración de la muestra de ensayo: Espasmofoorte. (Promedio $\pm$ DE, n= 3)

Lote	Réplica	Área pico (mV)	C (%)	C (mg/mL)
E2005	Promedio	2957057,50	93,21	233,03
	DE	28464,58	0,94	2,34
	CV (%)	0,96	1,00	1,00
Criterio aceptación: 90-110 % (225-275 mg/mL) contenido de Metamizol sódico.				

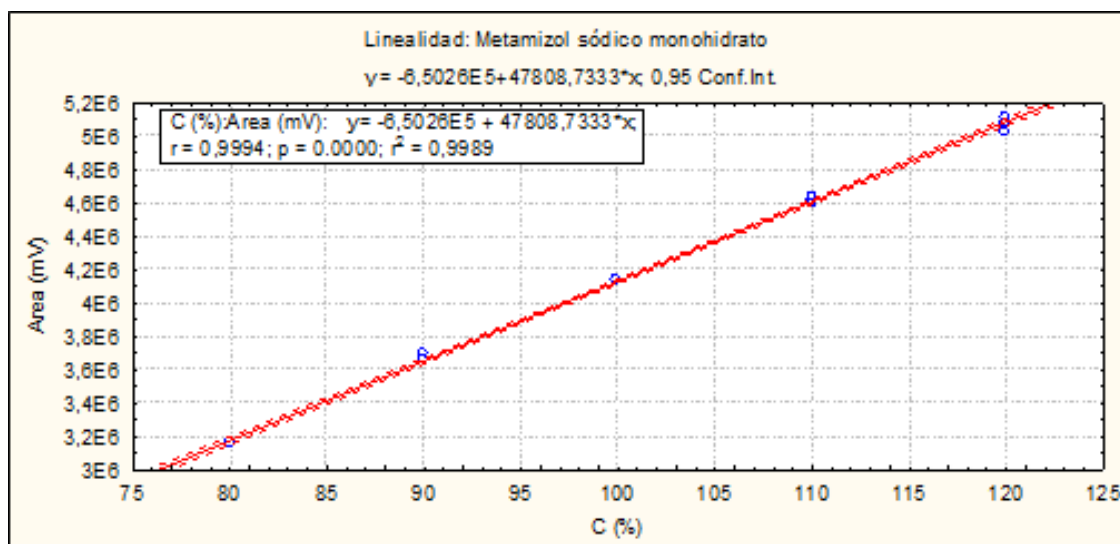


Fig. 4. Linealidad del sistema (Materia Prima, IFA): Curva de calibración: área del pico contra concentración (%) del Metamizol sódico.

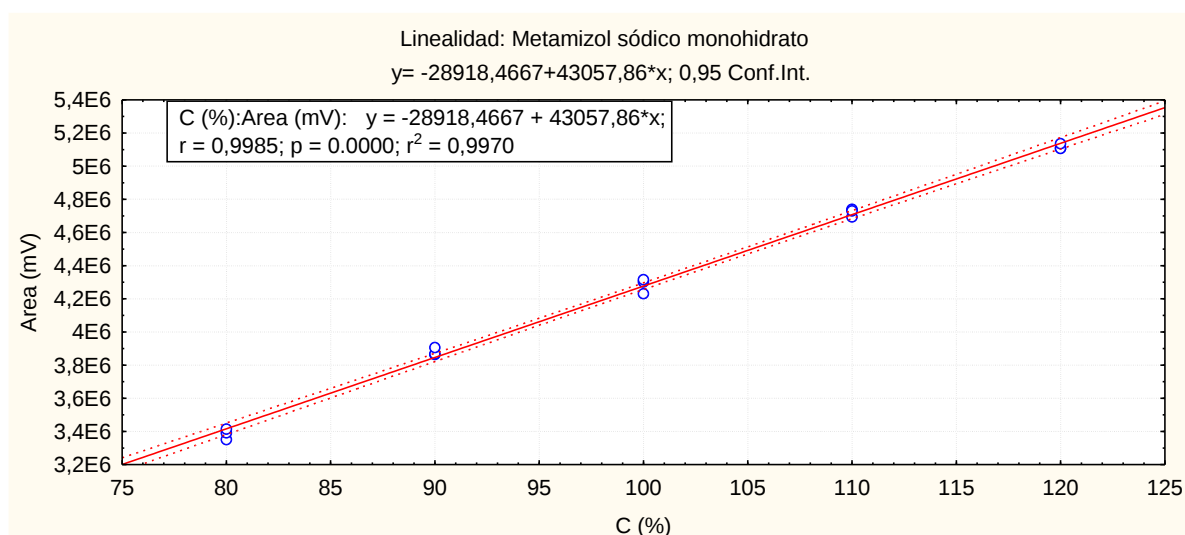


Fig. 5. Linealidad del sistema (Dipirona-600): Curva de calibración: área del pico contra concentración (%) del Metamizol sódico.

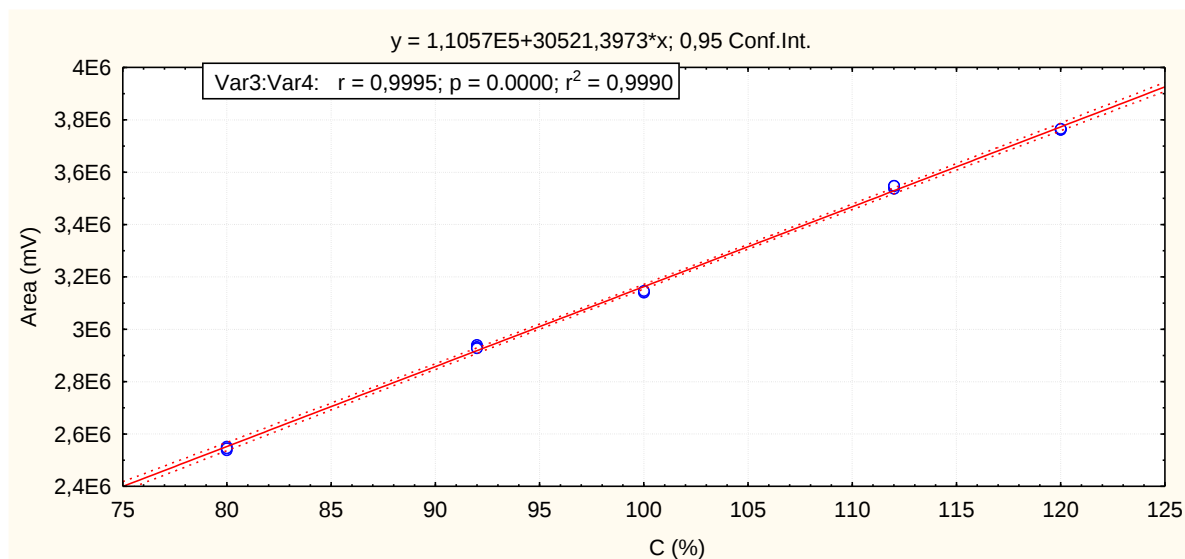


Fig. 6. Linealidad del sistema (Espasmofoorte): Curva de calibración: área del pico contra concentración (%) del Metamizol sódico.

El método cromatográfico validado, se empleó en la valoración de siete lotes de materias primas, tres lotes de Dipirona-600 y un lote de Espasmofoorte (Tabla 9, 10 y 11), obteniendo resultados satisfactorios al cumplir con los criterios de aceptación para el contenido de 99-101 % respecto a la sustancia seca (Farmacopea Británica, 2020) y de 90-110 % (Técnica del fabricante); respectivamente.

Debido a los resultados obtenidos en la validación del método, se puede emplear para realizar la valoración del Metamizol sódico o Dipirona (Materia prima y producto terminado) en los Laboratorios de Control de Proceso, de Control de la Calidad; y en los estudios de estabilidad de los inyectables: Dipirona-600 y el Espasmofoorte.

CONCLUSIONES

El método cromatográfico (HPLC) validado para la valoración del Metamizol sódico, en la materia prima y los productos terminado (Dipirona-600 y Espasmofoorte), cumplió con los criterios de aceptación para cada parámetro de validación o desempeño evaluados. El mismo se implementó en los laboratorios de control de la calidad físico-químico y mecánico (UEB AICA+) y en la realización de los estudios de estabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Farmacopea Argentina. 7maed. Argentina.2013.
- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Farmacopeia Brasileira. Brasilia; 2010.
- Achim H. The Analgesic Metamizole (Dipyrone) and Its Related Products Antipyrine, 4-Aminoantipyrine and 4-Methylaminoantipyrine. Part 1: Mass Spectrometric and Electrochemical Detection. World Journal of Chemical Education. 2018; 6 (3):134-44.
- British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia. 2020.
- Chinesse Pharmacopoeia. Chinese Chemical Engineering Press. Beijing; 1990.
- Chusnul Chotimah, Sudjadi, Sugeng Riyanto, and Abdul Rohman, Simultaneous Determination of Using UV-Spectroscopy in Combination with Multivariate

- Calibration Metamizole, Thiamin and Pyridoxin Adv Pharm Bull. 2015 Nov; 5(4): 593–598. Published online 2015 Nov 30. doi: 10.15171/apb.2015.080
- Daniella Carla Napoleão, Daniela Ribeiro da Silva, Joan M. Rodríguez Díaz, Mohand Benachour, Luis R. Bravo Sánchez y Valdinete da Silva. Análisis comparativo de la degradación de Dipirone utilizando el proceso de fotofenton con radiación uv-c y luz solar. cen. az. vol.42, no.1. Santa HPLCa, ene.-mar., 2015 *versión impresa* ISSN 0253-5777, *versión On-line* ISSN 2223-4861.
- Edwards J, Meseguer F, Faura C, Moore RA, McQuay HJ, Derry S. Single dose dipyrone for acute renal colic pain. *Cochrane Database Syst Rev* Published online October. 2002; 21. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003867>
- Galaon T, Radulescu M, David V, Medvedovici A. Use of an immiscible diluent in ionic liquid / ion pair LC for the assay of an injectable analgesic. *Central European Journal of Chemistry*. 2012; 10 (4):1360-7.
- Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009
- Hearn L, Derry S, Moore RA. Single dose dipyrone (metamizole) for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 4:CD011421. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011421.pub2>
- Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, et al. Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J*. 2007; 21(10): 2343-2351. <https://doi.org/10.1096/fj.06-8061com>.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline June 1995 CPMP/ICH/381/95.
- Jasiecka A, Maślanka T, Jaroszewski JJ (2014). "Pharmacological characteristics of metamizole". *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 17 (1): 207–14. doi:10.2478/pjvs-2014-0030. PMID 24724493.
- Metamizole. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metamizole>, First published: 17 December 2020, <https://doi.org/10.1111/bcp.14703>
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
- Mayorga R, Sánchez JE, Gutiérrez RF, Calixto-Romo M. Degradation of sodium metamizole by enzymatic extracts from some white rot fungi. *Sydowia*. 2017; 69: 205-11.
- Quino, Israel; Choque, Rigoberto; Cáceres C., Luis Fernando. Validación de una nueva determinación espectrofotométrica para dipirone en fármacos, *Revista Boliviana de Química*, vol. 22, núm. 1, -, 2005, pp. 64-70, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Real Farmacopea Española. 3raed. Madrid; 2005.
- Regulación No. 41-2015. Validación de métodos analíticos. CECMED.
- Senyuva H, Ozcan S, Aksahin I, Kabasakal B. Rapid, simple and accurate liquid chromatography–diode array detection validated method for the determination of Dipyrone in solid and liquid dosage forms. *Analytic Chemical Acta*. 2005; 547(1):73-7
- ICH Harmonised Tripartite Guideline June 1995 CPMP/ICH/381/95. PART I: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: DEFINITIONS AND METHODOLOGY
- Tsahi T. Lerman, Moshe Sagi, Yair Shafir, Liron Sheena, Eytan Cohen, Elad Goldberg and Ilan Krause (2021) A possible increased risk of metamizole-

associated neutropenia among COVID-19 patients. Brithis Journal Clinical Pharmacology. 2021; 1–5.