

Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas

M. Bor*, A. Guilarte, L. Guzmán, K. Macías y W. Mendoza

Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia.

Universidad Central de Venezuela

Validation of method for RP-HPLC for the determination of Thiocolchicoside e in tablet

Validació d'un mètode per RP-HPLC per a la determinació de Tiocolchicoside en pastilles

RECEIVED: 31 MARCH 2017; REVISED: 7 JULY 2017; ACCEPTED: 24 JULY 2017

SUMMARY

It was developed and validated an analytical methodology by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) simple, rapid, reproducible and stability indicating for the quantification of Thiocolchicoside tablets. The mobile phase consisted of a mixture of methanol: acetonitrile:water in the ratio (30:10:60) at pH = 8,00 ± 0,05. The mobile phase flow was 0,8 mL / min. Column chromatography was used for reverse phase (C-18). Detection was performed using a diode array detector at a wavelength of 371 nm. The use of diode detector allowed us to perform peak purity analysis in forced degradation testing and spectral differences were found in the first phase for samples subjected to hydrolysis acid for seven days. These differences may be attributed to the presence of degradation products. The validated method proved to be selective, accurate, linear with a coefficient of determination of 0,999 exact with a recovery percentage of 99,16% and 100,46%. The results obtained with the analytical method proposed for the evaluation of Thiocolchicoside tablets allow to quantify the drug with a high degree of confidence.

Keywords: Quality control; stability indicating; RP-HPLC; thiocolchicoside; validation.

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC), sencillo, rápido, reproducible e indicador de la estabilidad, para la cuantificación del Tiocolchicósido en tabletas. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol: acetonitrilo: agua en la proporción (30:10:60) a pH de 8,00 ± 0,05. El flujo de la fase móvil

fue de 0,8 mL/min. Se empleó una columna cromatográfica en fase inversa (C18). La detección se realizó empleando un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 371 nm. El uso del detector de diodos permitió realizar el análisis de pureza de pico en las pruebas de degradación forzada, en dicho análisis se encontraron diferencias espectrales en la primera fase para las muestras sometidas a hidrólisis ácida durante siete días, estas diferencias pueden atribuirse a la presencia de productos de degradación. El método validado demostró ser específico, preciso, lineal con un coeficiente de determinación de 0,999, exacto con un porcentaje de recuperación de 99,16 % y el 100,46%. Los resultados obtenidos con el método analítico propuesto para la evaluación de tabletas de Tiocolchicósido permiten cuantificar el fármaco con un alto grado de confianza.

Palabras clave: Control de calidad; indicadores de estabilidad; RP-HPLC; tiocolchicósido; validación.

RESUM

Es va desenvolupar i validar un mètode per cromatografia líquida d'alta eficiència en fase inversa (RP-HPLC), senzill, ràpid, reproducible i indicador de l'estabilitat, per a la quantificació del tiocolchicoside en pastilles. La fase mòbil va consistir en una barreja de metanol: acetonitril: aigua en la proporció (30:10:60) a pH de 8,00 ± 0,05. El flux de la fase mòbil va ser de 0,8 mL/min. Es va emprar una columna cromatogràfica en fase inversa (C18). La detecció es va realitzar emprant un detector d'arranjament de díod-

*Corresponding author: marisabel.bor@gmail.com

des a una longitud d'ona de 371 nm. L'ús del detector de díodes va permetre realitzar l'anàlisi de puresa de bec en les proves de degradació forçada; en aquesta anàlisi es van trobar diferències espectrals en la primera fase per a les mostres sotmeses a hidròlisi àcida durant set dies, aquestes diferències poden atribuir-se a la presència de productes de degradació. El mètode validat va demostrar ser específic, precís, lineal amb un coeficient de determinació de 0,999, exacte, amb un percentatge de recuperació de 99,16% i el 100,46%. Els resultats obtinguts amb el mètode analític proposat per a l'avaluació de rajoles de tiocolchicoside permeten quantificar el fàrmac amb un alt grau de confiança.

Paraules clau: Control de qualitat; indicadors d'estabilitat; RP-HPLC; tiocolchicoside; validació.

INTRODUCCIÓ

Tiocolchicosido (THC), químicament denominat (N-[(7S)-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroximetil]oxan-2-il]oxi-6,7-dihidro-5H-benzo[a]heptalen-7-il]acetamida) és un derivat semisintètic sulfurat del colchicosido¹. La seva fórmula molecular és $C_{27}H_{33}NO_{10}S$ i la seva estructura química es presenta a la figura 1². Aquest fàrmac és emprat en dolors associats a espasms musculars, degut al seu efecte farmacològic com a relaxant muscular, analgèsic i antiinflamatori³.

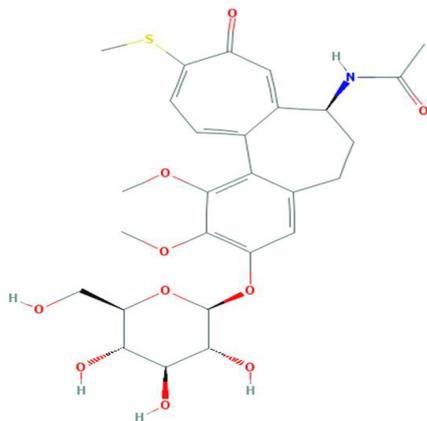


Figura 1. Estructura química de THC¹.

El anàlisi de Tiocolchicosido per a tabletas recobertes no apareix reportat en cap de les monografies oficials consultades. La Farmacopea dels Estats Units (USP) i Farmacopea Europea (EP) no reporten metodologia analítica per a aquest medicament. El desenvolupament d'un mètode que permeti analitzar Tiocolchicosido en Tabletats, tant en la fase de formulació d'un nou producte farmacèutic (per exemple, per a medicaments genèrics), com en els estudis d'estabilitat del producte i finalment en proves de control de qualitat, representen una important contribució en la confirmació de la qualitat d'aquest medicament, el qual és àmpliament utilitzat en dolors de tipus músculo esquelètic. Una

vegada desenvolupada la metodologia analítica, és necessari garantir que la mateixa proporcionarà resultats fiables, és per això que s'ha de procedir a validar el mètode. Perquè un procediment pugui ser validat, és necessari considerar les recomanacions suggerides en textos oficials, entre ells destaca la USP 38, específicament en el capítol <1225> "Validación de los Procedimientos del Farmacopeicos"⁴. Els procediments per a la validació de mètodes analítics segons la USP estan directament relacionats amb les pautes establertes en la Conferència Internacional d'Armonització (ICH), específicament en el text "Validación de procedimientos analíticos: texto y metodología" Q2 (R1)⁵. Entre les tècniques d'anàlisi més utilitzades en medicaments s'encuentra la Cromatografia Líquida de Alta Eficiència (HPLC), ja que té una alta sensibilitat i rapidesa. En aquest treball s'explica una nova metodologia analítica i la seva validació per a la determinació de Tiocolchicosido en tabletats, utilitzant la tècnica analítica HPLC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Per a la validació de la metodologia s'utilitzà un cromatògraf líquid de alta eficiència de la casa comercial Waters, format per una bomba model 600E, un inyector Automuestrador, model 717 de Plus, un detector de arregl de díodes, model PDA 996. El cromatògraf està connectat a un ordinador amb un programa Millennium 32⁷. S'utilitzà una columna Sunfire C18 (L1) 5 µm, 4,6 x 250 mm. Les condicions experimentals del cromatògraf líquid foren les següents: fase mòbil composta per metanol: acetonitril: aigua en les proporcions 30:10:60 ajustada a pH = 8,0 amb àcid o-fosfòric 85%. Flux de fase mòbil = 0,8 mL/min, volum d'injecció = 20 µL i longitud d'ona = 371 nm.

Les mesures de pH foren realitzades amb el potenciòmetre Orion Research model 601 A. L'aigua utilitzada per a tots els anàlisis prové del equip de destil·lació Cascada Ro Waters (Pall Corporation) i purificada en l'ultrapurificador d'aigua Barnstead (Nanopure). Totes les mostres foren filtrades abans de ser injectades en el cromatògraf amb membranes de filtració millipore de nylon, mida de poro de 0,45 µm.

Patrón

S'empregà un patró secundari de Tiocolchicosido, fabricat per Dromex International, pureza = 99,2 ± 0,1 %.

Muestras

La mostra utilitzada per a la validació d'aquest mètode consistí en un material de referència intern (MRI), ja que no s'existia cap material de referència certificat (MRC). El MRI ha de ser preparat al laboratori per al seu ús intern^{6,7}. El MRI es realitzà barrejant homogèneament 30 tabletats de tres fabricants diferents, 10 per a cada fabricant, tots els medicaments emprats presentaven la mateixa forma farmacèutica i la mateixa dosi fabricats

en Venezuela (tabletas de 4 mg de Tiocolchicósido). El propósito de trabajar con un MRI es poder ofrecer una metodología que pueda ser aplicada como una prueba universal de calidad, según lo establecido en la USP 38, en el capítulo <2> *Medicamentos orales- Pruebas de calidad de productos*⁸.

Validación del método analítico

La validación del método analítico se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en el capítulo general <1225> de la USP 38⁴ e ICH Q2 (R1)⁵. Los parámetros evaluados corresponden específicamente a la categoría I para la cuantificación de THC, estos son: especificidad, linealidad, precisión (precisión del sistema cromatográfico, repetibilidad y precisión intermedia) y exactitud.

Especificidad y pruebas de indicadores de estabilidad

La especificidad fue evaluada mediante dos pruebas: evaluación de la pureza de pico cromatográfico y estudios de degradación forzada, estos últimos también permiten realizar estudios de indicadores de estabilidad⁸. Para comprobar si el método desarrollado es indicador de la estabilidad, se sometieron las muestras a pruebas de estrés, para ello se pesó por sextuplicado el equivalente a 1 mg de Tiocolchicósido contenido en el MRI en balones aforados de 25 mL, para así obtener una concentración de 0,04 mg/mL de Tiocolchicósido, disuelto en fase móvil. Cada muestra se trató como se indica a continuación:

- **Muestra control:** no se le realizó ningún tratamiento previo.
- **Hidrólisis ácida:** añadir a la muestra 2 mL de ácido clorhídrico 4 N y se dejó en reposo durante 7 días.
- **Hidrólisis básica:** añadir a la muestra 2 mL de hidróxido de sodio 4 N y se dejó en reposo durante 7 días.
- **Fotólisis:** exposición de la muestra a radiación visible durante 7 días continuos.
- **Humedad:** se colocó la muestra dentro de un desecador con una solución salina saturada. La humedad relativa dentro del desecador era de 60%. Se dejó en reposo durante 7 días.
- **Termólisis:** calentamiento de la muestra en baño de agua a 90 °C durante 4 horas.
- **Oxidación:** añadir a la muestra 2 mL de peróxido de hidrógeno al 35% y se dejó en reposo durante 7 días.

Una vez culminado el tiempo de exposición, se llevó cada muestra a volumen con fase móvil. Adicionalmente se preparó un patrón control de THC a la concentración de 0,04 mg/mL. Se estudiaron los cromatogramas obtenidos y gracias al detector de arreglo de diodos (PDA) se pudo realizar el estudio de los gráficos de pureza de las señales cromatográficas para cada una de las pruebas. El software Millennium 32 permitió calcular los ángulos de pureza y ángulos de umbral. Con toda la información obtenida, se pudo ratificar la presencia de productos de degradación y especificidad del método⁹.

Linealidad

Para el estudio de la linealidad del método fue seleccionado el rango de concentración 0,020 mg/mL a 0,060 mg/mL de patrones de THC, siendo el punto central de la curva el correspondiente al 100% la concentración de 0,040 mg/mL. Las concentraciones de los patrones usados en la curva de calibración fueron: 0,020 mg/mL, 0,032 mg/mL, 0,040 mg/mL, 0,048 mg/mL y 0,060 mg/mL, todas ellas preparadas en fase móvil. Al realizar la integración de las señales cromatográficas, se obtuvo el área bajo la curva, la cual depende de la concentración del patrón. Con esta información se construyó la curva de calibración y a través de ella se determinó la ecuación de la recta y los parámetros de mejor ajuste (coeficiente de determinación R²).

Precisión

Se evaluó a través de la precisión del sistema cromatográfico, repetibilidad y precisión intermedia.

Para el estudio de la precisión del sistema cromatográfico, se realizaron 5 inyecciones de patrón, posteriormente se determinó el promedio del área bajo la curva de las señales cromatográficas obtenidas y tiempo de retención, se calculó coeficiente de variación (CV) utilizando la ecuación 1.

$$CV(\%) = (s/\bar{x}) * 100 \quad (1)$$

Donde s corresponde a la desviación estándar y \bar{x} al promedio del área bajo la curva de las determinaciones.

La repetibilidad se evaluó analizando seis muestras a la concentración del 100% (0,040 mg/mL) y determinando la cantidad de THC presente en ellas, utilizando la curva de calibración. La repetibilidad del método analítico se determinó mediante el cálculo del promedio y CV de las seis muestras, según lo establecido en la ICH⁵, así como el cálculo de los intervalos de confianza.

$$\bar{x} \pm t^*s/\sqrt{n} \quad (2)$$

Donde \bar{x} = promedio de las serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración

t = valor t de Student según las tablas, para n-1 grados de libertad y $\alpha=0,05$

n = número de análisis

s = desviación estándar

Para el estudio de la precisión intermedia, se analizaron muestras al 100% por diferentes analistas, utilizando el mismo equipo. Se determinaron los valores promedio, s y CV. Adicionalmente, se aplicó el criterio de aceptación para la precisión intermedia, basado en el coeficiente de variación de Horwitz¹⁰.

$$CV_H(\%) = 2^{(1-0.5) \log C} \quad (3)$$

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

El coeficiente de variación de Horwitz debe ser comparado con el coeficiente de variación obtenido de las nueve determinaciones realizadas, mediante el parámetro Horrat.¹⁰

$$P_{\text{Horrat}} = CV/CV_H \quad (4)$$

Sí el P_{Horrat} es menor a 2, se puede afirmar que el método tiene valores aceptables de precisión intermedia.¹⁰

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 80%, 100% y 130% de la curva de calibración. Se realizaron nueve determinaciones (tres réplicas de las tres concentraciones). Para calcular el porcentaje de recuperación se aplicó la ecuación 2.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{(C_{\text{fortificada}} - C_{\text{sin fortificar}}) * 100}{C_A} \quad (5)$$

Donde $C_{\text{fortificada}}$ es la concentración de THC en la muestra fortificada, $C_{\text{sin fortificar}}$ la concentración de THC en la muestra sin fortificar y C_A es la concentración del THC añadido. Seguidamente se realizó el cálculo de t con un límite de confianza de 95%.

Aplicación del método propuesto para la determinación de Tiocolchicosido en tabletas

Una vez validado el método analítico, se procedió a realizar la determinación de THC en tabletas de tres fabricantes distintos, a los cuales se les designaron los nombres de medicamentos A, B y C distribuidas en el mercado venezolano. Todos estos medicamentos declaraban 4 mg de THC por tableta. Las muestras fueron tratadas por separado, según la metodología propuesta y se determinó: cantidad de THC (mg/tabletas), CV (%) y porcentaje con respecto a lo declarado

$$\% \text{ con respecto a lo declarado} = \frac{C_{\text{encontrada}}}{C_{\text{declarada}}} * 100 \quad (6)$$

Donde $C_{\text{encontrada}}$ se refiere a la cantidad de THC encontrada según el análisis y $C_{\text{declarada}}$ corresponde a la Cantidad de THC reportada por el fabricante. La USP establece que los porcentajes con respecto a lo declarado deben encontrarse entre 90-110%. En general, la aceptación *a priori* de una variación de $\pm 10\%$ a partir de la cantidad declarada esperada (100%) en la mayoría de los casos pretende tomar en cuenta la variabilidad de la fabricación y la estabilidad durante la vida útil, ya que tal variación tiene una menor probabilidad de ocasionar un impacto adverso perceptible en el resultado clínico deseado⁸.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 2 se presentan los cromatogramas del patrón y muestra de THC, respectivamente, preparados a la concentración de 0,04 mg/mL. En ambos cromatogramas se puede observar que no existen interferencias en la señal cromatográfica correspondiente a THC.

Especificidad

Las muestras sometidas a las pruebas de estrés fueron analizadas y los resultados obtenidos se compararon con patrón y muestra control. En la figura 3 se presentan los cromatogramas correspondientes a las muestras de THC en tabletas sometidas a las diferentes pruebas de degradación forzada.

Se puede observar la presencia de señales cromatográficas adicionales a THC solamente en las muestras

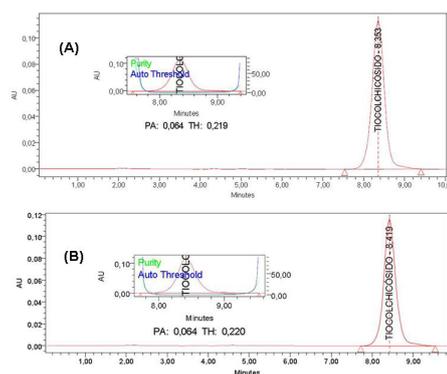


Figura 2. Cromatogramas y gráficos de pureza de patrón de THC (A) y muestra de THC (B)

Figura 2. Cromatogramas y gráficos de pureza de patrón de THC (A) y muestra de THC (B).

sometidas a hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación con peróxido de hidrógeno. En el caso de la muestra sometida a hidrólisis básica se puede apreciar, además de la presencia de señales cromatográficas adicionales, la drástica desaparición de la señal correspondiente a THC, lo cual puede ser atribuido a su inestabilidad en medio básico. El mismo fenómeno ocurrió cuando la muestra se expuso a la oxidación con peróxido de hidrógeno. Los análisis comparativos de los cromatogramas obtenidos demuestran la especificidad del método analítico, al no evidenciarse interferencias ni solapamientos con respecto a señal cromatográfica correspondiente a THC. También se estudiaron los gráficos de pureza cromatográfica, gracias al detector de arreglo de diodos (PDA) utilizado. En la Tabla 1 se reportan los ángulos de pureza (PA) con ángulos del umbral (TH) de las muestras estudiadas.

Tabla 1. Ángulos de pureza y ángulos de umbral para las muestras de Tiocolchicosido sometidas a las pruebas de degradación forzada.

Condición	Ángulo de pureza (PA)	Ángulo del umbral (TH)
Patrón Control	0,064	0,219
Muestra Control	0,064	0,220
Hidrólisis ácida	2,417	0,355
Hidrólisis básica	-	-
Fotólisis	0,093	0,226
Humedad	0,087	0,232
Termólisis	0,100	0,233
Oxidación con H ₂ O ₂	-	-

Se puede observar que para todos los casos el PA es menor a TH, exceptuando la muestra sometida a hidrólisis ácida. Este hecho podría atribuirse a la presencia de un producto de degradación que esté coeluyendo con el analito. Esta prueba demuestra que el método propuesto puede ser utilizado como un indicador de estabilidad⁹.

Linealidad

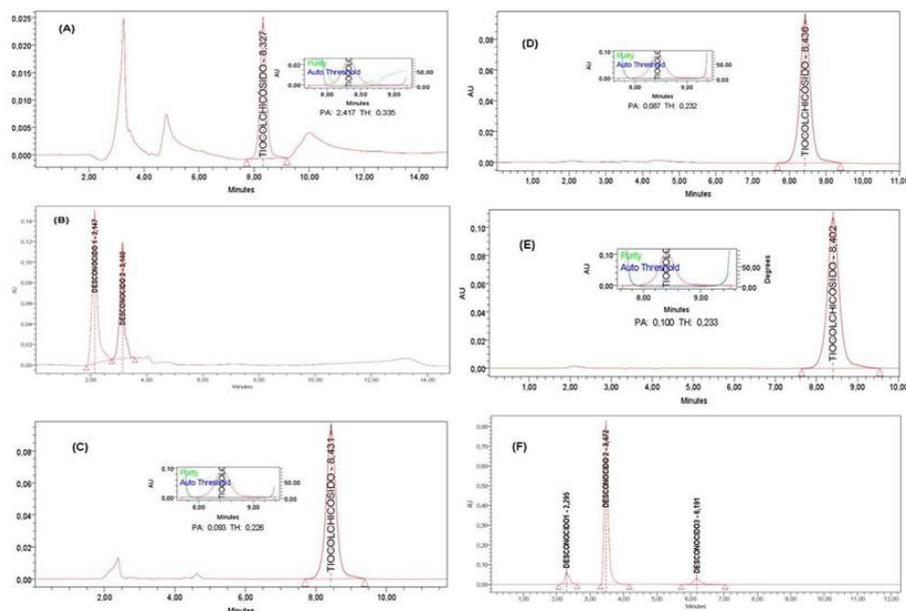


Figura 3. Cromatogramas y gráficos de pureza de muestras sometidas a pruebas de degradación a forzada: (A) Hidrólisis ácida (B) Hidrólisis básica (C) Exposición a la radiación visible (D) 75% Humedad relativa a 25°C Termólisis a 90°C (F) Oxidación.

Se realizó una curva de calibración con cinco niveles de concentración: 0,020, 0,032, 0,040, 0,048 y 0,060 mg/mL. La concentración del punto central de la curva era 0,040 mg/mL.

En la figura 4 se muestra la curva de calibración obtenida en función del área total de las señales cromatográficas frente a la concentración del patrón, la cual corresponde a una línea recta cuya ecuación es: $y = 6 \times 10^7 x + 27240$ con un $R^2 = 0,9998$ lo cual indica que existe una relación lineal entre el área y concentración.

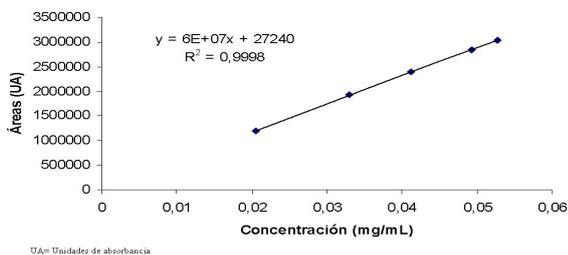


Figura 4. Curva de calibración para el análisis de Tiocolchicosido. Ajuste de mínimos cuadrados

Figura 4. Curva de calibración para el análisis de Tiocolchicosido. Ajuste de mínimos cuadrados.

Precisión

Precisión del sistema cromatográfico

Fue determinada sobre 5 réplicas del patrón a la concentración de 100% (0,040 mg/mL). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2.

Los valores de coeficiente de variación, 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 para la precisión del sistema.

Tabla 2. Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas de patrón de Tiocolchicosido.

Réplica	Tiempo de retención (min)	Áreas
1	8,353	2431753
2	8,347	2447698
3	8,348	2402935
4	8,345	2436775
5	8,340	2435468
\bar{x}	8,347	2430926
s	0,005	16736
CV (%)	0,060	0,7

\bar{x} = promedio s = desviación estándar cv = coeficiente de variación

Repetibilidad

Los resultados obtenidos en la evaluación la repetibilidad del método analítico, se muestran en la tabla 3. El promedio del contenido de THC encontrado en las seis muestras fue de 3,99 mg (99,74% con respecto a lo declarado) y coeficiente de variación 0,70%. Los resultados muestran la repetibilidad del método analítico, ya que el valor de coeficiente de variación fue menor a 2%. El límite de confianza, calculado con la ecuación (2) ($t_{\text{tab}} = 2,306$; $n=9$; $\alpha=0,05$): $(3,99 \pm 0,54)$ mg

Tabla 3. Repetibilidad en la determinación de Tiocolchicosido en seis muestras.

Muestra	Concentración de THC encontrada \pm 0,01 (mg)	% con respecto a lo declarado*
1	3,97	99,20
2	3,96	99,05
3	4,01	100,25
4	3,96	99,10
5	4,02	100,60
6	4,01	100,25
\bar{x}	3,99	99,74
s	0,03	0,69
cv	0,70	0,70

*Cantidad declarada de THC= 4mg

Precisión intermedia

Los resultados para evaluar la precisión intermedia del método analítico basado en la variación de la cantidad de THC determinada por diferentes analistas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Precisión intermedia en la determinación Tiocolchicósido realizada por tres analistas diferentes.

Muestra	Cantidad encontrada de THC (mg)		
	Analista 1	Analista 2	Analista 3
1	4,10	4,21	4,15
2	4,03	4,20	4,23
3	4,06	4,14	4,23
\bar{x}	4,04	4,18	4,20
s	0,03	0,05	0,04
cv	0,78	1,29	0,09

El promedio de los nueve resultados fue de 4,15 mg (103,72% con respecto a lo declarado) y coeficiente de variación fue igual a 1,76%. Este resultado indica que el método es preciso, ya que el coeficiente de variación es menor a 2%.

Al aplicar el criterio de aceptación para la precisión intermedia, basado en el coeficiente de variación de Horwitz, calculado con la ecuación (4), se encontró que el mismo presentó un valor de 3,36%. Este resultado se comparó con el coeficiente de variación obtenido de las nueve determinaciones realizadas, aplicando la ecuación (5) se calculó el parámetro de Horrat (P_{Horrat}). El P_{Horrat} para este método presentó un valor de 0,52. Como P_{Horrat} es menor a 2, se puede afirmar que el método tiene valores aceptables de precisión intermedia¹⁰.

Exactitud

Los resultados del estudio de la exactitud son presentados en la tabla 5.

Se puede observar que la metodología es exacta, ya que los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran dentro del rango establecido para cada uno de los niveles (80%, 100% y 130%). 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%⁹. En función a estos resultados se confirma que el método analítico es exacto.

Al aplicar la prueba de t, se observó que el valor de t observado ($t_{ob} = 0,706$) ($\alpha = 0,05$ v= 8) es menor con

respecto al encontrado en las tablas (2,306)¹². Los límites de confianza al 95% ($t_{tab} = 2,306$; n=9; $\alpha=0,05$) de los porcentajes de recuperación obtenidos, aplicando la ecuación (2) fue:

$$(99,59 \pm 1,55)\%$$

Tabla 5. Exactitud expresada como porcentaje de recuperación de Tiocolchicósido.

Nivel	% Recuperación	\bar{x}	s	s ²
80	102,03	99,17	2,5825	6,6696
	97,00			
	98,48			
100	100,62	100,46	2,5248	6,3748
	97,86			
	102,90			
130	100,48	99,13	1,2237	1,4975
	98,81			
	98,10			
\bar{x}	99,58			
s	2,02			
cv	2,02			

Análisis de tabletas de Tiocolchicósido

En la tabla 6 se presentan los resultados del análisis de las tres marcas comerciales de tabletas de Tiocolchicósido analizadas según el método analítico propuesto.

Los resultados obtenidos en el análisis de los medicamentos A, B y C demuestran que el método es capaz de cuantificar Tiocolchicósido con precisión y exactitud, ya que en todos los casos los resultados cumplen satisfactoriamente con los criterios establecidos en la USP, es decir, coeficientes de variación menores a 2% y porcentajes con respecto a lo declarado entre un (90-110) %.

Tabla 6. Determinación del contenido de Tiocolchicósido en tabletas de tres marcas comerciales distintas.

Muestras	C _{THC} (mg/tabletas)	\bar{X} (mg/tabletas)	s	CV (%)	
A	A-1	4,244	4,27	0,03	0,73
	A-2	4,260			
	A-3	4,304			
B	B-1	4,262	4,23	0,05	1,22
	B-2	4,168			
	B-3	4,251			
C	C-1	4,210	4,21	0,03	0,73
	C-2	4,239			
	C-3	4,178			

CONCLUSIONES

El método analítico para la determinación de Tiocolchicósido en Tabletillas presenta un comportamiento lineal en el rango de concentraciones entre 0,020 a 0,060 mg/mL y un coeficiente de determinación=0,999. El método demostró ser preciso, exacto y específico, cumpliendo con los criterios establecidos

por la ICH para la validación de métodos analíticos. El método analítico puede ser aplicado como un método rutinario para pruebas de control de calidad y como un indicador de estabilidad. La aplicación del método para el análisis de tabletas de Tiocolchicosido 4 mg cumple de manera satisfactoria con los criterios de aceptación, proporcionando la confianza de que el medicamento analizado presenta la calidad necesaria para ser administrado a los pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo prestado por parte de los miembros del Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

1. Umalkar A.; Bavaskar S.; Yewale P. Thiocolchicoside as Muscle Relaxant: a Review. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2011**, *1*, 364- 371.
2. Pubchem. Open chemistry database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Coltramy> (consultado Ene 25, 2016)
3. Venkatachalam T.; Lalitha K.G. Reverse-phase HPLC Method for Simultaneous Analysis of Thiocolchicoside and Ketoprofen in Tablet Formulations. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2013**, *5*, 679-682.
4. Validación de procedimientos farmacopeicos. *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, USP 38-NF 33; USA, 2015; Vol. 1, pp 1581-1587.
5. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 2005, pp 1-13.
6. Valcarcel M.; Ríos A. La calidad en los laboratorios analíticos; Reverté: Madrid, 2002; pp 182-184.
7. Barwick V. *Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation* [en línea]; 3^{ra} ed. 2016; pp 38-39.
8. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem_CITAC_QAC_2016_EN.pdf (consultado Nov 10, 2016).
9. Medicamentos orales- pruebas de calidad de productos. *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, USP 38-NF 33; USA, **2015**, *1*, 71-74
10. Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI) Validación de métodos analíticos, Barcelona, 2001; pp 46-55.
11. Horwitz W.; Albert R. The Horwitz ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 1095-109.
12. Lister A.S. Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*; Ahuja S.; Dong M.W. Elsevier Inc. United Kingdom, 2005; pp 191-217.
13. Miller J.; Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Prentice Hall: Madrid, 2004; p.263.